

Die dilatative Kardiomyopathie als Folge einer Strukturstörung des Zellkernes und aberrierenden Zellkernfunktion

Eine ultrastrukturelle und immunhistochemische Studie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von
aus

Beatrix Barth, geb. Heinrichs
Münster

Giessen

2001

Aus dem Max-Planck-Institut
für Physiologische und Klinische Forschung
Kerckhoff-Institut
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
in Bad Nauheim

Gutachterin: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper
Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation: 06. Juni 2002

für Theresa, Julius und Ernst

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	3
2.1. PATIENTEN UND ENTNAHME DER GEWEBEPROBEN	3
2.2. ELEKTRONENMIKROSKOPIE	4
2.2.1. Fixierung	4
2.2.2. Einbettung	4
2.2.3. Mikrotomie	4
2.2.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung	5
2.2.5. Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder	5
2.2.5.1. Bewertung des Kernes	5
2.2.5.2. Bewertung des Myokards	6
2.3. KONFOKALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE	6
2.3.1. Fixierung und Fluoreszenz-Feulgen-Färbung zum Nachweis der DNA	6
2.3.2. Fixierung und Inkubation mit einem Antikörper zur Darstellung der Transkriptionsaktivität der Kerne	7
2.3.3. Konfokale Lasermikroskopie	8
3. ERGEBNISSE	9
3.1. ERGEBNISSE DER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG	9
3.1.1. Kerngröße	11
3.1.1.1. Kontrollgruppe	11
3.1.1.2. DCM-Patientengruppe	11
3.1.2. Kernform	12
3.1.2.1. Kontrollgruppe	12
3.1.2.2. DCM-Patientengruppe	13
3.1.3. Position des Kernes innerhalb des Myozyten	18
3.1.3.1. Kontrollgruppe	18
3.1.3.2. DCM-Patientengruppe	18
3.1.4. Chromatinverteilung	19
3.1.4.1. Kontrollgruppe	19
3.1.4.2. DCM-Patientengruppe	20
3.1.4.2.1. Reguläre Chromatinverteilung	20

	Seite
3.1.4.2.2. Chromatinaggregation	20
3.1.4.2.3. Kontrastarme Kerne	21
3.1.4.2.4. Ischämie	21
3.1.4.2.5. Apoptose	22
3.1.4.2.6. Perichromatingranula	23
3.1.4.2.7. Interchromatingranula	24
3.1.5. Kernmembran	25
3.1.5.1. Kontrollgruppe	25
3.1.5.2. DCM-Patientengruppe	26
3.1.5.2.1. Membranverlauf	26
3.1.5.2.2. Pseudoeinschlüsse	26
3.1.5.2.3. Unterbrochene Kernmembran	29
3.1.5.2.4. Brückenbildung durch die Kernmembran	32
3.1.5.2.5. Intranukleäre Tubuli	33
3.1.5.2.6. Kompartimente innerhalb des Kernes	36
3.1.6. Intranukleäre Einschlüsse	39
3.1.6.1. Kontrollgruppe	39
3.1.6.2. DCM-Patientengruppe	39
3.1.6.2.1. Intranukleäre Mitochondrien	39
3.1.6.2.2. Intranukleäre Vakuolen	41
3.1.6.2.3. Nukleäre Einschlußkörperchen (bodies)	42
3.1.6.2.4. Einschlüsse unklarer Zusammensetzung	42
3.1.7. Besonderheiten im Nukleoplasma	43
3.1.7.1. Kontrollgruppe	43
3.1.7.2. DCM-Patientengruppe	43
3.1.7.2.1. Filamentäres Material	43
3.1.7.2.2. Kernpore	46
3.1.7.2.3. Nukleäre-Body-ähnliche Struktur	46
3.1.7.2.4. Einschlüsse/Pseudoeinschlüsse mit unterbrochener Kernmembran	48
3.1.8. Nukleolus	50
3.1.8.1. Kontrollgruppe	50
3.1.8.2. DCM-Patientengruppe	50

	Seite
3.1.8.2.1. Größe der Nukleoli	51
3.1.8.2.2. Anzahl der Nukleoli	53
3.1.8.2.3. Form der Nukleoli	53
3.1.8.2.4. Lage im Kern	57
3.2. ERGEBNISSE DER KONFOKALEN MIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG	57
3.2.1. Ergebnisse der Fluoreszenz-Feulgen-Färbung	57
3.2.2. Ergebnisse der Immunfluoreszenzreaktion mit monoklonalem Anti-Splicing Faktor SC 35	59
4. DISKUSSION	63
4.1. PATHOHISTOLOGIE BEI DCM	63
4.2. MORPHOLOGIE DES ZELLKERNES	65
4.2.1. Elektronenmikroskopischer Befund	65
4.2.2. Kernfunktion	67
4.3. VERÄNDERUNGEN DER KERNGRÖSSE UND –FORM	68
4.4. PERINUKLEÄRES AREAL	69
4.5. POLYPLOIDISIERUNG DES KERNES	70
4.6. CHROMATINVERTEILUNG & TRANSKRIPTIONSAKTIVITÄT	72
4.7. MEMBRANAUFFÄLLIGKEITEN	75
4.7.1. Membranverlauf und Pseudoeinschlüsse	75
4.7.2. Intranukleäre Tubuli	76
4.7.3. Intranukleäre Kompartimentbildung	77
4.7.4. Unvollständige membranöse Separierung	78
4.7.5. Intranukleäre Einschlüsse	78
4.8. NUKLEÄRE EINSCHLUSSKÖRPERCHEN (BODIES)	80
4.9. PATHOLOGIE DES NUKLEOLUS	81
4.10. ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG UND ARBEITSHYPOTHESE	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	87
6. LITERATURVERZEICHNIS	89
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
8. LEBENSLAUF	103
9. DANKSAGUNG	105

1. Einleitung

Die Kardiomyopathien sind Herzmuskelerkrankungen, die weder durch eine Koronarerkrankung noch durch Hypertonie im kleinen oder großen Kreislauf oder Vitien des Herzens bedingt sind (45).

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) stellt eine Form der Kardiomyopathien dar, die durch Dilatation des linken oder beider Ventrikel mit Erhöhung des enddiastolischen Volumens und verminderter linksventrikulärer Auswurfraction ausgezeichnet ist (40).

Das Herzgewicht ist erhöht, Hypertrophie aufweisend, aber die maximale linksventrikuläre Wandstärke und die des Septums sind normal aufgrund der abnormal dilatierten Ventrikel (27).

Die klinische Signifikanz liegt in der progredienten Herzinsuffizienz, die medikamentös schwer beherrschbar ist. Die Prognose ist ungünstig (55).

Das Endstadium ist klinisch durch schwere Herzinsuffizienz (NYHA Stadium 4) gekennzeichnet, die oft nur noch mit Herztransplantation behandelt werden kann.

Die histologische Aufarbeitung zeigt ein differenziertes Bild: Das Myokard bei DCM weist Hypertrophie, Atrophie von Myozyten neben einer erhöhten Rate an interstitieller Fibrose auf.

Die ultrastrukturellen Veränderungen beinhalten Vergrößerung und Formveränderungen des Zellkernes, zahlreiche kleine Mitochondrien, Proliferation des T-Systems, Akkumulation von Lipid und Glykogen, und besonders auffällig ist der Verlust an Myofibrillen (84).

Der Myofibrillenverlust ist begleitet vom Überleben anderer Organellen, wie Kern und Mitochondrien, was als Zeichen einer Degeneration bei Hypertrophie und Abgrenzung zur Nekrose zu werten ist (65). Der Verlust an Myofibrillen resultiert möglicherweise aus einer Synthesestörung des Kernes (73).

Die Pathogenese und die primäre Störung, die die ultrastrukturellen Veränderungen bei DCM bedingen, sind noch unbekannt, die Beteiligung der nukleären Funktionen wird von Schaper et al angenommen (85). Der Zellkern wird auch von Scholz et al für die Veränderung des Myokards aufgrund einer gestörten Kernfunktion verantwortlich gemacht (87).

Trotz der zahlreichen Arbeiten über strukturelle Veränderungen gibt es nur wenig Literatur, die sich mit dem Kern beschäftigt.

Die in der Literatur beschriebenen morphologischen Veränderungen bei DCM sind nicht pathognomonisch (14), jedoch typisch für unspezifische Hypertrophie.

Inwieweit der Kern und seine Alterationen spezifisch für DCM sind, wird aufzuzeigen sein.

Ghadially beschreibt den Zellkern als bemerkenswertes Forschungsobjekt aufgrund des Fehlens an offensichtlichen Veränderungen und Details im Gegensatz zu dem Reichtum an Veränderungen im Zytoplasma (42).

Daß der Kern als Träger der genetischen Information und verantwortlich für die Steuerung der Transkription und Translation des Myozyten deutliche Veränderung der Ultrastruktur bei DCM aufweist und dadurch Rückschlüsse auf die synthetische Aktivität ermöglicht werden, soll in dieser Arbeit aufgezeigt werden.

Folglich soll Gegenstand dieser Arbeit die systematische Darstellung der Morphologie und Pathologie des Zellkerns bei DCM sein, um ein besseres Verständnis pathogenetischer Mechanismen der DCM zu erzielen.

2. Material und Methoden

2.1. PATIENTEN UND ENTNAHME DER GEWEBEPROBEN

Es wurden sechs Herzen von Patienten, die an DCM im Spätstadium erkrankt waren, untersucht.

Der Zeitpunkt der Erstdiagnose lag zwischen 3 bis 20 Jahren zurück.

Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich um eine Frau und fünf Männer im Alter von 33 bis zu 58 Lebensjahren. Zum Transplantationszeitpunkt waren die Patienten im Mittel 51,5 Jahre alt.

Diese Patienten wurden herztransplantiert aufgrund von bestehender Herzinsuffizienz des Stadiums IV der New York Heart Association (NYHA).

Die linksventrikuläre Auswurffraktion lag echokardiographisch gemessen unter 20%.

Die Patienten litten unter keinerlei Stoffwechselstörung.

Als Kontrollgruppe für die Elektronenmikroskopie und die Immunhistochemie zur Darstellung der Transkriptionsaktivität der Kerne wurden zwei Herzen von männlichen Patienten herangezogen, die an therapierefraktären Arrhythmien litten und aus dieser Indikation heraus transplantiert wurden. Die Patienten waren 45 und 49 Jahre alt.

Bei der Fluoreszenz-Feulgen-Färbung zur Darstellung des DNA-Gehaltes der Zellkerne wurde neben diesen noch drei weitere Patienten im Alter zwischen 27 und 68 Jahren in die Kontrollgruppe einbezogen. Damit waren die Patienten dieser Kontrollgruppe zum Transplantationszeitpunkt im Mittel 45 Jahre alt.

Es lag, basierend auf den üblichen klinischen Untersuchungen, keine Hypertrophie vor, die linken Ventrikel waren normal.

Unmittelbar nach Explantation der Herzen wurde noch im Operationssaal aus dem linken Ventrikel unter größtmöglicher Schonung der Klappenebene eine Gewebescheibe entnommen, aus dieser wurden etwa 30 Gewebeproben gewonnen.

Das verbleibende Myokard des Explantates wurde schnellstmöglich weiter versorgt, um die bei DCM intakten Herzklappen als menschliches Klappenersatzmaterial (Homograph) weiter verwenden zu können und wurde anschließend nach Leiden, Niederlande (zentrale Sammelstelle), geschickt.

2.2. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

2.2.1. Fixierung

Sofort nach der Entnahme wurden die Gewebeproben in eine Fixierungslösung aus 3% Glutaraldehyd und 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (4°C, pH 7,4, 400 mOsm) verbracht.

Nach Ablauf von vier bis sechs Stunden wurden die Proben mehrfach in einer Lösung aus Cacodylatpuffer und Saccharose (7,5%) gewaschen.

Die Präparate verblieben mindestens drei Tage in der Pufferlösung, die wiederum täglich ausgewechselt wurde.

Die Postfixierung wurde in einer Lösung aus Osmiumtetroxid (1,6% OsO₄) in Veronalacetatpuffer (pH 7,4, 4%, 400 mOsm) vorgenommen.

Das Auswaschen der Postfixationslösung geschah im Anschluß daran mit dem Veronalacetatpuffer.

2.2.2. Einbettung

Nach Fixierung und mehrfachen Waschschritten wurden zur Vorbereitung der Einbettung die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

Anschließend wurde der Alkohol durch Zuführung von Propylenoxid entfernt.

Über zwölf Stunden wurden dann die Präparate in einer Mischung aus Propylenoxid und Epon inkubiert.

Der nächste Schritt war die endgültige Einbettung in Epon.

Nach Inkubation im Wärmeschränk bei 50°C über drei Tage war die Polymerisation der Proben abgeschlossen.

2.2.3. Mikrotomie

Die eingebetteten Präparate wurden für die Ultramikrotomie getrimmt und Ultradünnschnitte (Schnittdicke 50 nm) mit einem Ultramikrotom (Ultracut E Fa. Leica) hergestellt und auf Kupfergrids aufgefangen.

Zur Kontrastierung wurde eine 5%ige Uranylacetatlösung verwandt, mit einer Einwirkzeit von zwei Minuten.

Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen, eine erneute Kontrastierung wurde mit Bleicitratlösung (400 mOsm, pH 7,4) und eine abschließende Waschung mit Aqua dest. vorgenommen.

2.2.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Untersuchung der Schnitte wurde an einem Transmissionselektronenmikroskop vom Typ Philips TEM 201 durchgeführt.

In einer geringen Vergrößerung (am Mikroskop Einstellung 1500, 2000 oder 3000 - folglich auf Papierebene eine Vergrößerung von 9900, 13200 oder 19800fach) wurde zunächst das gesamte Präparat begutachtet.

Wenn das Präparat im Netzquadrat des Grids eine Kernstruktur von Kardiomyozyten aufwies, wurde diese in einer geringen Vergrößerung fotografiert.

Es wurde dann der Kern eingestellt und systematisch zunächst in 4500facher Vergrößerung am Mikroskop (demnach 29700facher Vergrößerung auf Papierebene), dann in 7000facher Vergrößerung am Mikroskop (folglich 46200facher Vergrößerung auf Papierebene) abgelichtet.

Wenn der jeweilige Kern Besonderheiten oder pathologische Veränderungen aufwies, wurden diese in der jeweils erforderlichen Vergrößerung dargestellt.

Auch Kernanschnitte oder Kerne, die auf dem Gridraster teilweise zu liegen kamen, wurden dokumentiert, um nicht schon im Vorfeld eine Auswahl zu treffen.

2.2.5. Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder

Ein Bewertungsschema diente zum Darstellen und Einschätzen der morphologischen Veränderungen des Myokards bei DCM mit besonderer Betonung auf dem Zellkern.

2.2.5.1. Bewertung des Kernes

Die Nukleusgröße wurde beurteilt, wobei hier auf geringe, mittlere, starke Zunahme der Kerngröße oder normale Größenverhältnisse Wert gelegt wurde.

Die Form des Kernes wurde auf Einziehungen, gelapptes Erscheinungsbild und Zerklüftungen der Kernstruktur untersucht.

Das Vorhandensein von Einschlüssen und Invaginationen wurde festgestellt.

Die Chromatinverteilung wurde klassifiziert auf Regelmäßigkeit.

Es wurde ermittelt, ob Nukleoli in einfacher, doppelter oder vielfacher Anzahl im Kern nachweisbar waren.

2.2.5.2. Bewertung des Myokards

Festgehalten wurde die strukturelle Zusammensetzung der kernumgreifenden Zone, d.h. des perinukleären Areals.

Die Myofibrillen wurden nach Z-Streifen-Anordnung und Auftreten von Kontraktionsbändern bewertet.

Die Mitochondrien wurden nach Größe, Anzahl und Zustand der Cristae beurteilt.

Aufweitung des sarkoplasmatischen Retikulums und T-Systems wurden verzeichnet, sowie das Vorhandensein von Lipofuscingranula.

Es wurde allgemein beurteilt, ob das Gewebe normal erschien oder ob Veränderungen vorlagen. Diese wurden in Schweregrade eingeteilt: geringe (+), mittlere (++) und hochgradige (+++) Veränderung.

Sonstige hier nicht aufgelisteten Auffälligkeiten wurden unter Bemerkungen notiert.

2.3. KONFOKALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die für die Fluoreszenzmikroskopie bestimmten Gewebeproben wurden noch im Operationssaal in flüssigen Stickstoff zur Konservierung eingebracht.

Nach Aufblockung wurden 5 μm dicke Gefrierschnitte mit Hilfe des Kryostaten 1720 der Firma Leica hergestellt.

2.3.1. Fixierung und Fluoreszenz-Feulgen-Färbung zum Nachweis der DNA

Die Fluoreszenz-Feulgen-Färbung dient dem spezifischen Nachweis der DNA und erlaubt die photometrische Quantifizierung über die Absorptionsmessung des Reaktionsproduktes.

Die Gefrierschnitte wurden über 10 Minuten in Carnoy fixiert. Carnoy ist eine Fixierungslösung aus 60 ml 100%igem Alkohol, 30 ml Trichlormetachloroform und 10 ml Essigsäure.

Anschließend wurden die Präparate in Aqua dest. Eingebracht und in 1N HCl abgespült. Zur Hydrolyse erfolgte das Einstellen in 1N HCl bei 60°C über 10 Minuten. Anschließendes Spülen in Leitungswasser wurde durchgeführt.

Unter dem Abzug wurden dann die Schnitte über 5 Minuten in frisch angesetzter Auraminlösung eingestellt. Auraminlösung besteht aus 50 ml Aqua dest., 0,12 g Auramin, 0,5 g Kaliummetalisulfit und 10 ml N HCl.

Ausgewaschen wurde dann unter fließendem Leitungswasser, eine Entwässerung erfolgte in steigender Alkoholreihe und Xylol und eine abschließende Eindeckelung mit Entelan.

Die Lagerung der Präparate wurde im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt.

2.3.2. Fixierung und Inkubation mit einem Antikörper zur Darstellung der Transkriptionsaktivität der Kerne

Um die Antigenizität und die Zugänglichkeit der antigenen Determinanten für den Antikörper zu erhalten, wurden die Gefrierschnitte, die für die Immunhistochemie angefertigt wurden, 10 Minuten in 4%iger Formalinlösung (aus Paraformaldehyd hergestellt) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2-7,4 fixiert.

Zweimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) erfolgte über jeweils 3 Minuten.

Bei der von uns durchgeführten indirekten Methode der Immunfluoreszenz war der primäre, an das Antigen bindende Antikörper unkonjugiert und wurde durch einen sekundären, gegen ihn gerichteten und biotinylierten Antikörper nachgewiesen, und anschließend wurde dieser über ein Chromogen-Konjugat detektiert.

Der monoklonale Anti-Splicing Factor SC 35 reagiert mit dem Splicing-Faktor SC 35 und ermöglicht eine Aussage zur Aktivität der Spliceosome und daher zur Transkriptionsaktivität des Kernes.

Die Inkubation der Präparate mit monoklonalem Anti-Splicing-Faktor SC 35 clone SC 35 (Maus, Product No S 4045, Fa. Sigma) wurde in dunkler und feuchter Kammer über 1 Stunde bei einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt.

Gewaschen wurden die Schnitte wieder zweimalig über 3 Minuten in PBS.

Die Schnitte wurden mit dem Antikörper Biotin donkey anti-mouse (Fa. Dianova) in feuchter und dunkler Kammer über eine Stunde bei einer Verdünnung 1:100 erneut inkubiert.

Bei der hier durchgeführten Biotin-Streptavidin-Komplex-Methode wurde dann, um die Sensitivität zu erhöhen, mit Cy-2 konjugiertem Streptavidin (Fa. Biotrend, Rockland) bei einer Verdünnung von 1:100 über 30 Minuten erneut inkubiert.

Dann erfolgte eine Kernfärbung mit Propidium, Verdünnung 1:100 über 10 Minuten, und die Eindeckelung mit Mowiol erfolgte abschließend.

Die Präparate wurden dunkel bei 4°C gelagert.

2.3.3. Konfokale Lasermikroskopie

Die fixierten und markierten Präparate wurden an einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica untersucht.

Die Messungen erfolgten unter standardisierten Bedingungen und Einstellungen des Mikroskopes mit einem 40er Objektiv.

Die Präparate wurden systematisch im Blickfeld links oben beginnend durchgemustert, und pro Patient wurden 50 zufällig ausgewählte Kerne der Myozyten vermessen, d.h. ihre Abgrenzung wurde umfahren.

Die dabei gewonnenen Datensätze wurden zur digitalen Bildverarbeitung auf eine Silicon Graphics Indy-Workstation übertragen, die DNA-Menge und die Transkriptionsaktivität errechnet und anschließend statistisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. ERGEBNISSE DER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG

Der Zellkern besteht aus der Kernmembran, dem Nukleoplasma und dem Chromatin sowie dem Nukleolus.

Es wurden in der folgenden Untersuchung die physiologischen Werte der Kontrollgruppenpatienten den pathologischen, morphologischen Veränderungen der Myozytenkerne der Patienten, die an DCM erkrankt sind, gegenübergestellt.

Charakteristisch für das morphologische Korrelat der DCM ist das gleichzeitige Vorkommen von physiologisch erscheinenden, neben gering und hochgradig pathologisch veränderten Myozyten, sowie auch komplett degenerativ zerstörten Gewebsanteilen, so daß ein sehr inhomogenes Erscheinungsbild nachzuweisen war.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der elektronenmikroskopischen Bewertung dieser Arbeit auf eine statistische Auswertung verzichtet, und im folgenden werden die erhobenen Befunde deskriptiv dargestellt und beurteilt.

Gegenstand dieser Arbeit war die Darstellung der pathologischen Veränderungen der Morphologie des Zellkernes und seiner direkt benachbarten Sarkoplasmaanteile (s. Tab. 1).

Die befundeten Myozytenkerne zeigten Veränderungen der Größe, der Kernform, der Kernmembran und Chromatinverteilung.

Es wurden sarkoplasmatische Einschlüsse im Kern und Pseudoeinschlüsse nachgewiesen.

Die Anzahl wie auch die Form der Nukleoli waren verändert.

Die kernumgrenzende Zone zeigte sich stark aufgeweitet.

Im folgenden werden diese pathohistologischen Veränderungen im Detail beschrieben und anhand der zugehörigen Bilder dokumentiert.

Tabelle 1: Qualitative Bewertung des Myokards der DCM-Patienten und der Patienten mit normalem linken Ventrikel. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Einzeluntersuchungen der Zellkerne und des perinukleären Areals der Patienten, es wurden pro Patient 150-200 Zellkerne untersucht. Obwohl innerhalb des Myokards der Patienten sehr divergierende Befunde festzustellen sind, handelt es sich hier um repräsentative Mittelwerte der elektronenmikroskopischen Untersuchung.

Patienten	1	2	3	4	5	6	7	8
Nukleusgröße	normal groß klein 0 +++ +	0 ++ +	+	+	+	+	+++ 0 0	+++ 0 0
Nukleusform	gelapt Einziehungen zerklüftet +++ ++ +	++ ++ +	+	+	+	+	0 + 0	0 + 0
Einschlüsse	+++	+	+	++	+++	++	0	0
Chromatinverteilung	Regelmäßig unregelmäßig ++ +	++ ++	+++ 0	++ +	++ 0	+++ 0	+++ 0	+++ 0
Nukleolus	Einfach doppelt viele ++ ++ +++	0 + ++	+	+	+	++ + ++	+++ + 0	+++ + 0
Perinukleärer Raum	erweitert ++	+	++	0	+	+	0	0
Mitochondrien	kleine Größe große Anzahl Cristae aufgelöst +++ +++ +	++ ++ ++	++ ++ +	+	+	++ ++ ++	0 + ++	0 + +
Lipofuscingranula	+	+++	++	++	++	++	++	++
Sarkopl. Retikulum	aufgeweitet 0	0	+	+	0	0	0	0
Myofibrillen	Z-Streifen-Anordnung Kontraktionsbänder ++ teilw.irreg.	++ teilw.irreg.	irregulär +	regulär +	regulär ++	teilw.irreg. +	irregulär ++	irregulär ++
T-System	aufgeweitet 0	0	0	0	+	+	0	0
Diagnose	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM	Kontrolle	Kontrolle

(0) = nicht nachweisbar, (+) = geringe Ausprägung, (++) = mittlere Ausprägung, (+++) = hochgradige, deutliche Ausprägung der Veränderung/ des Merkmales

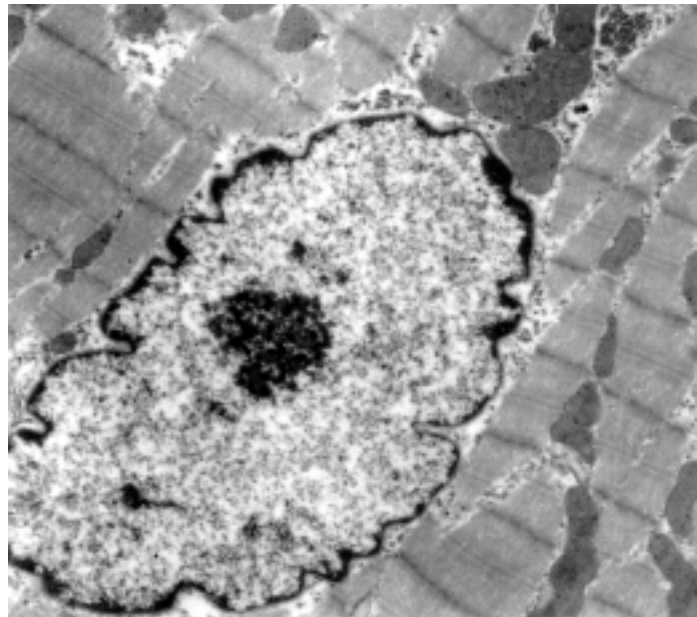
3.1.1. Kerngröße

3.1.1.1. Kontrollgruppe

Die Zellkerne der Myozyten der Patienten mit klinisch normalem linken Ventrikel waren längsoval, und die Länge der Kerne entsprach in Bezug zur Myofibrillenordnung der Myozyten zwischen 3 und 6 Sarkomerlängen, entsprechend einer Kernlänge von etwa 6-12 μm . (Eine Sarkomere ist im Zustand mittlerer Relaxation $\pm 2 \mu\text{m}$ lang.) Selten wurden gering längere Kerne nachgewiesen. Das Verhältnis Breite zu Länge der Kerne betrug etwa 1:2 bis 1:3 (s. Abb. 1).

Abb. 1: Kontrollpatient

Längsovaler Kern mit gering geschwungenem Membranverlauf (Länge entspricht 8 Sarkomerlängen, 16 μm Länge aufzeigend), gleichmäßige Chromatinverteilung, regelrechter Nukleolus. $\times 19800$



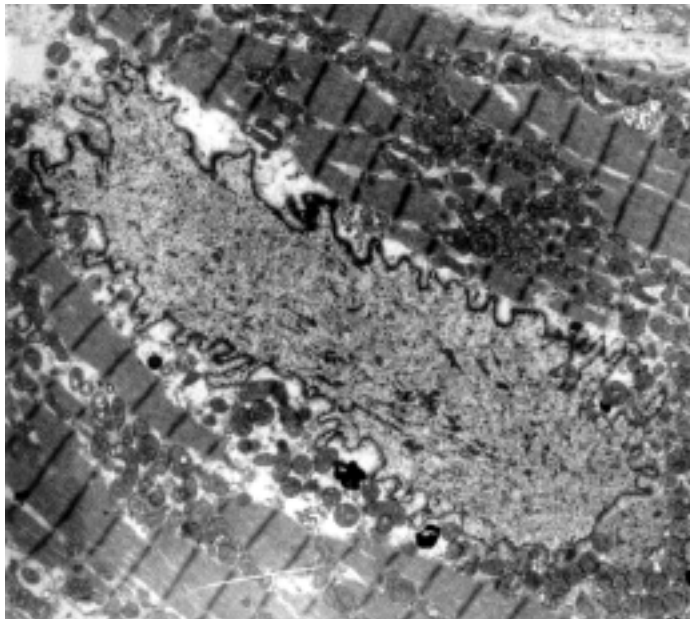
3.1.1.2. DCM-Patientengruppe

Die Myozytenkerne der an DCM erkrankten Patienten zeigten eine bemerkenswerte Größenvariabilität.

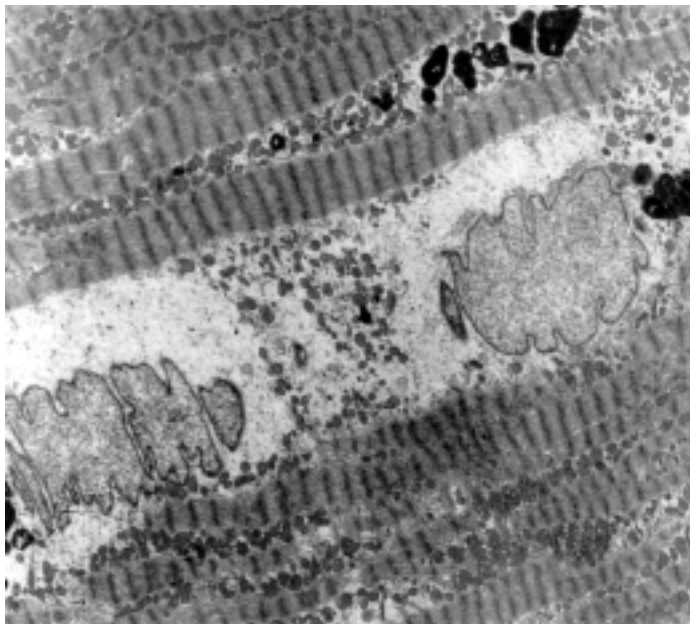
Neben physiologischen Kerngrößen kamen Kerne zur Darstellung, die in ihrer Längsachse, bezogen auf die Myofibrillenordnung des Myozyten, 10 und bis zu 20 Sarkomerlängen entsprechen. Dies bedeutet eine Länge von etwa 20 bis 40 μm (s. Abb. 2a).

Da Kerne häufig nicht als homogene Flächen erschienen, sondern wie später erläutert, durch mehrfache Anschnitte als zusammengesetzte Gebilde auffielen, konnten Kernlängen entsprechend bis zu 35 Sarkomerlängen vorkommen, eine Länge von etwa 70 μm darstellend (s. Abb. 2b).

Je nach Form des Kernes gab es auch sehr große Variablen in der Seitenausdehnung des Kernes. Wie im weiteren dargestellt, kam es zu regelrechten Seitenarmen des Kernes, die zu einer irregulären Myofibrillenordnung beitrugen.



*Abb. 2a: DCM-Patient
Längsovaler Kern mit deutlicher Membranfaltung, die nicht mit Kontraktionsartefakten zu erklären ist (Länge entspricht 16 Sarkomeren, 32 μm Länge aufzeigend). $\times 19800$*



*Abb. 2b: DCM-Patient
Durch Formanomalien kommt hier möglicherweise nur ein Kern zur Darstellung, der dann eine Länge von 64 μm hätte (entsprechend 32 Sarkomeren). $\times 13200$*

Aufgrund der übermäßigen Formvarianz war hier die Messung der Breite nicht zu leisten, weil durch Ausstülpungen die Festlegung der Meßebeune unmöglich erschien.

3.1.2. Kernform

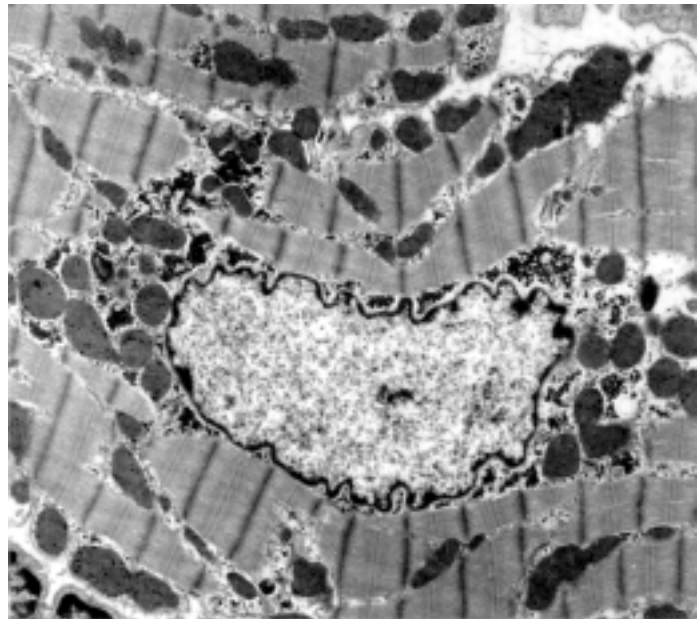
3.1.2.1. Kontrollgruppe

Die Zellkerne der Myozyten der Patienten der Kontrollgruppe hatten eine längsovale Form.

Traten Kontraktionsbänder an den Myofibrillen auf, so wiesen die Kerne auch ein eher rechteckiges Erscheinungsbild und runde Formen auf. Selten wurden L-förmige Kerne beobachtet.

Der Kern wurde in aller Regel als ein kompaktes Gebilde angeschnitten. Nur selten traten durch Krümmung oder Biegung des Kernes je nach Schnittebene mehrere Kernfragmente in Erscheinung (s. Abb. 3).

*Abb. 3: Kontrollgruppe:
Längsovaler Kern mit direkt an den
Kern heranreichenden Myofibrillen
und Zellorganellen. x 19800*



3.1.2.2. DCM-Patientengruppe

Die Myozyten der DCM erkrankten Patienten wiesen ovale und rechteckige Formen auf, es gab dabei sehr langgezogene Kerne. Außerdem wiesen die Herzen der DCM-Patienten L-, X-, U- und Z-ähnliche Kernformen auf, zusätzlich sind querovale, halbmond-, sichel- und sanduhrförmige Kerne beobachtet worden (s. Abb. 4a, 4b, 4c).

Die Kerne erschienen stark zerklüftet und hatten viele Furchen.

Es stellten sich neben großflächigen Kernanteilen kleine, keiner regelmäßigen Form zuzuordnende Anschnitte dar (s. Abb. 4d, 4e, 4f).

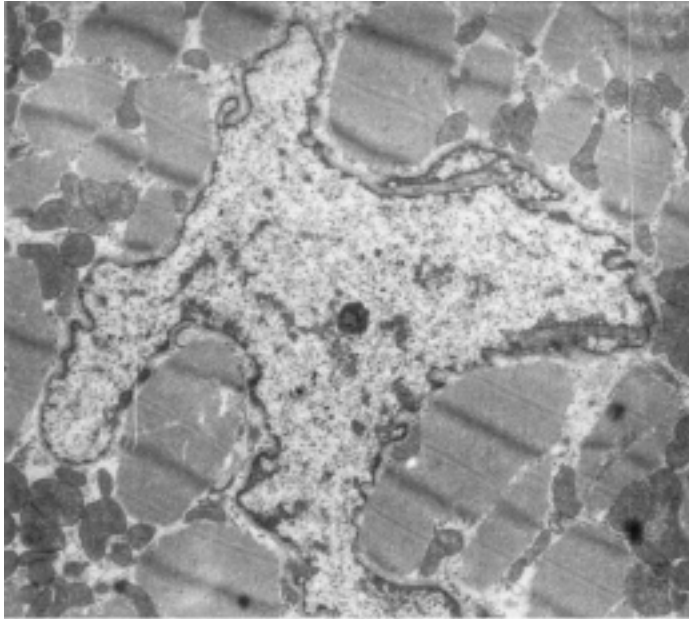
Es gab Kerne, die brückenähnlich geformte Membranverbindungen zu den noch restlichen Kernanteilen aufweisen (s. Abb. 4g, 4h).

Andere wiederum zeigten unter den verschiedenen Fragmenten des Kernes keinerlei Verbindung und waren durch Nukleusmembranen eindeutig voneinander separiert (s. Abb. 4f, 4g, 4i, 4j, 4k).

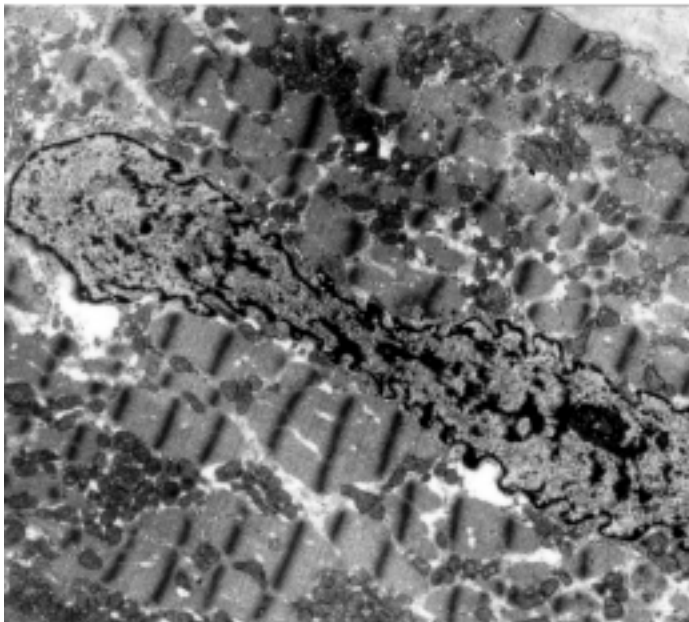
Durch Ausbuchtungen und Formauffälligkeiten einiger Kerne kam es zu einem zerstückelten Erscheinungsbild, und viele kleine Fragmente traten auf.

Auch lagen Anteile des Zytoplasmas in der Regel in Form von Myofibrillen und Mitochondrien zwischen den Kernanschnitten.

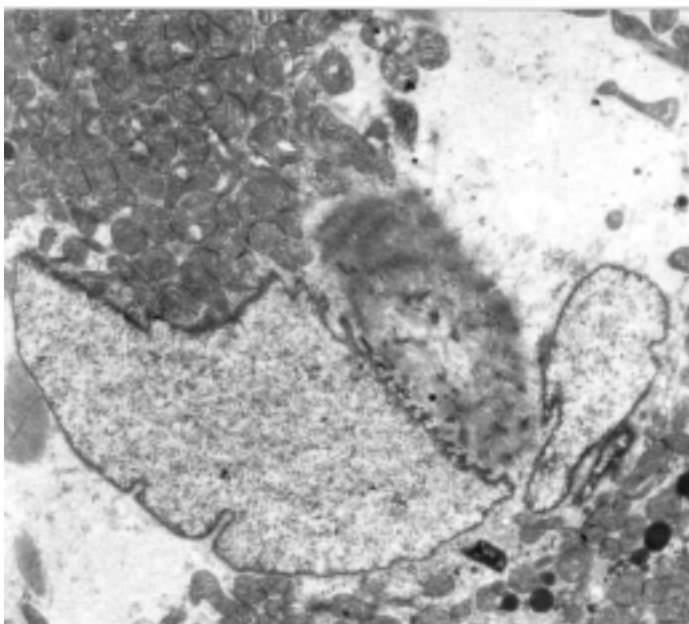
Eine eindeutige Festlegung, ob es sich hier um mehrkernige Myozyten handelte, war nicht zu leisten und wird noch zu diskutieren sein.



*Abb. 4a: DCM-Patient
x-förmiger Kern mit kleinem
Nukleolus, Ausläufer des Kernes
tragen zur unregelmäßigen Myo-
fibrillenordnung bei. x 29700*

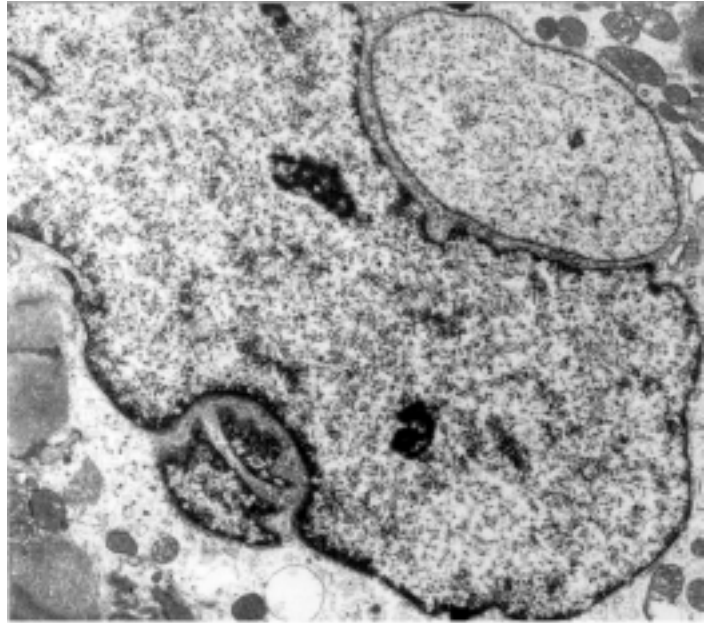


*Abb. 4b: DCM-Patient
Sanduhrförmiger Kern mit deut-
licher Zunahme der Länge, 20 Sar-
komerlängen entsprechend (bedeutet
40 μm Kernlänge). x 19800*

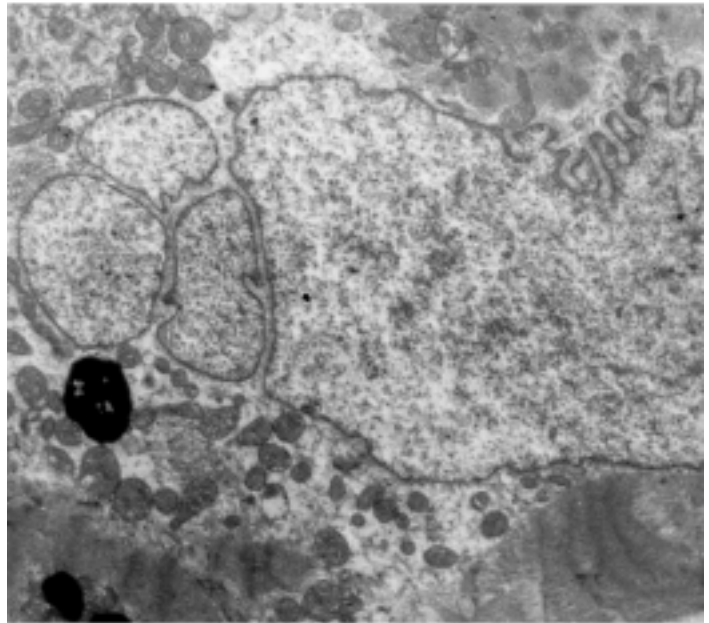


*Abb. 4c: DCM-Patient
Sichelförmiger Kern aus mehreren
Fragmenten bestehend. x 29700*

*Abb. 4d: DCM-Patient
Deutliche Verbreiterung des Kernes
bei gleichzeitigem Mehrfachanschnitt
infolge Formanomalie, be-
merkenswert auch die unter-
schiedliche Margination des Chro-
matins in den Fragmenten.
x 29700*



*Abb. 4e: DCM-Patient
Fragmentierung an einem Kernpol
bei deutlich verlängertem Kern.
x 29700*



*Abb. 4f: DCM-Patient
Stark zerklüfteter Kern ohne
erkennbare Grundform, einzelne
Areale erscheinen vom „Grund-
körper“ abgetrennt. x 46200*



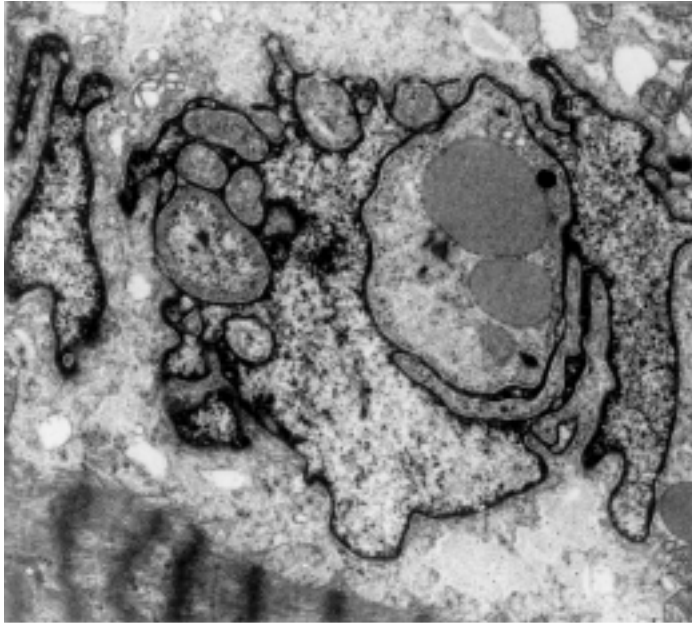


Abb. 4g: DCM-Patient
Brückenbildungen der Kern-
membran und Pseudoeinschlüsse
schließen große sarkoplasmatische
Areale ein, Kern ist keiner
Grundform mehr zuzuordnen.
x 46200

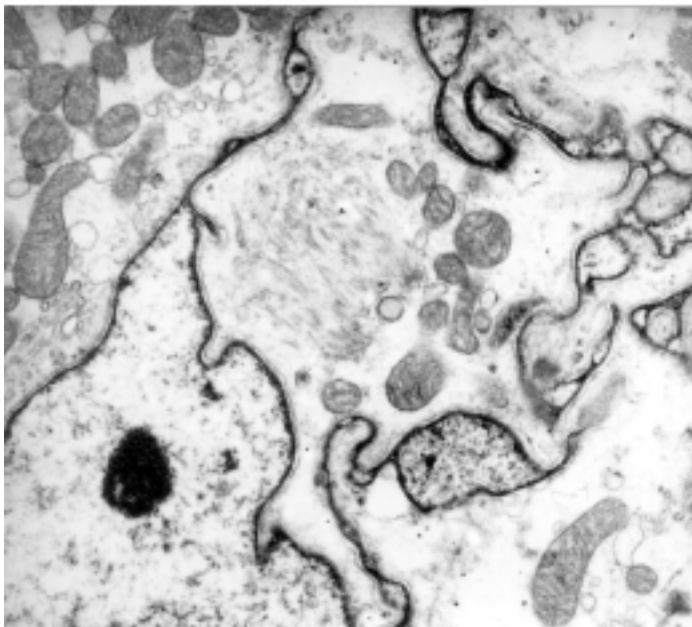


Abb. 4h: DCM-Patient
Brückenbildung durch die
Kernmembran mit verschmolzen
erscheinenden Arealen und in
unregelmäßigen Abständen ampul-
lenartige Aufweitungen mit wieder
auftretender nukleären Matrix.
x 66000

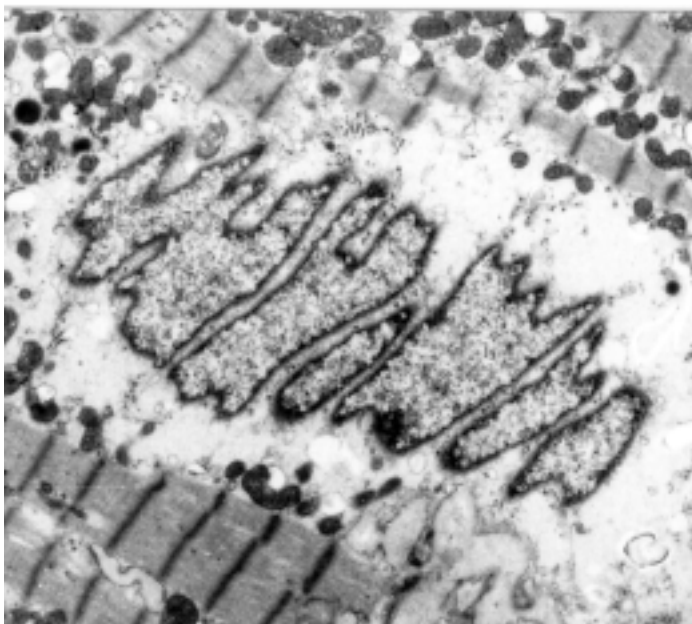
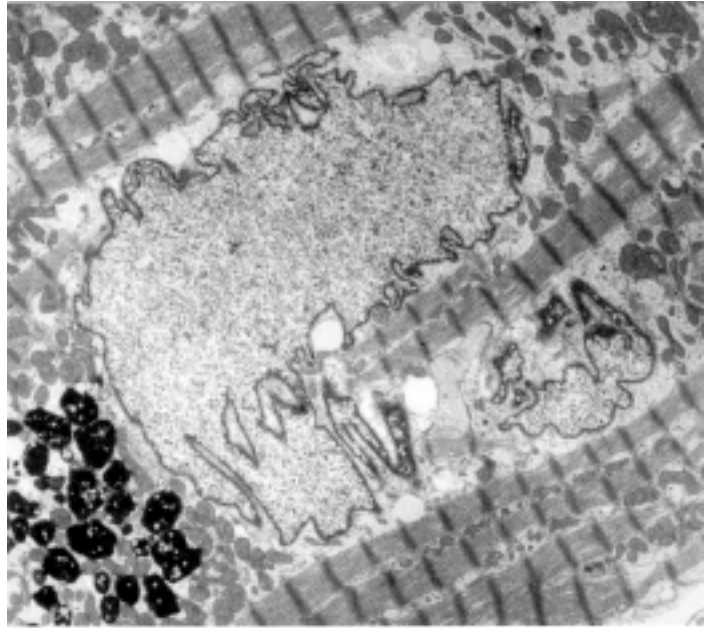
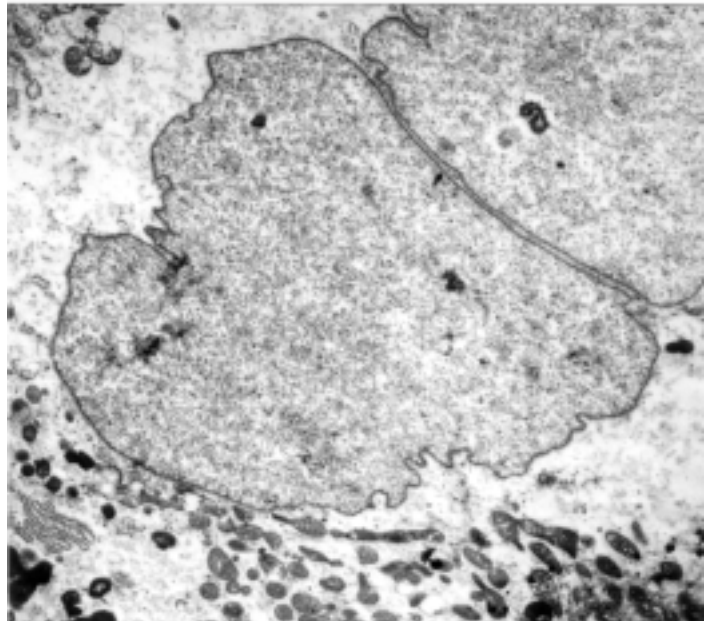


Abb. 4i: DCM-Patient
Formanomalien führen zu An-
schnitten, die miteinander keine
Verbindung haben. x 29700

*Abb. 4j: DCM-Patient
Fragmentierung des Kernes durch
tief ins Kerninnere reichende
Einziehungen, bemerkenswert: Pseudo-
einschlüsse. x 19800*



*Abb. 4k: DCM-Patient
Zwei Kernanschnitte erscheinen
aneinandergeschmiegt, Kernmem-
bran im Trennungsbereich voll-
ständig erhalten, bemerkenswert:
kleine Nukleoli. x 19800*



Die äußere Oberfläche der Kerne war durch viele Furchen und Ausstülpungen ausgezeichnet. Die daraus resultierenden Buchten für das Sarkoplasma waren aufgefüllt mit Zellorganellen. Es lagen dort Mitochondrien, Myofibrillen, Golgiapparat und sarkoplasmatisches Retikulum sowie fibrilläre Strukturen des Zytoskelettes (s. Abb. 4j).

Häufig war die Zerfurchung der Oberfläche nicht vollständig, sondern betraf nur eine Seite des Kernes. Die übrige Oberfläche war eher großförmig und regelmäßig, hingegen erschienen die von kleinen Einstülpungen betroffenen Anteile extrem zerfurcht und zerklüftet.

Es wurden Kerne aufgefunden, die eine kompakte normal erscheinende Grundstruktur aufwiesen. Ein Teilbereich dieser Kerne allerdings, der bis zu einem Drittel der dargestellten Kernflächen ausmachte, wurde durch tiefe Einziehungen der äußeren Oberfläche annähernd separiert vom restlichen Kern. Als solitärer Befund

wurde ein Kern nachgewiesen, der kometenähnliche Form aufwies durch Gliederung des Kernes in einen „Körper-“ und in einen „Schweif“-Anteil. Auf Besonderheiten in dessen weiterer Struktur wird später noch eingegangen werden.

3.1.3. Position des Kernes innerhalb des Myozyten

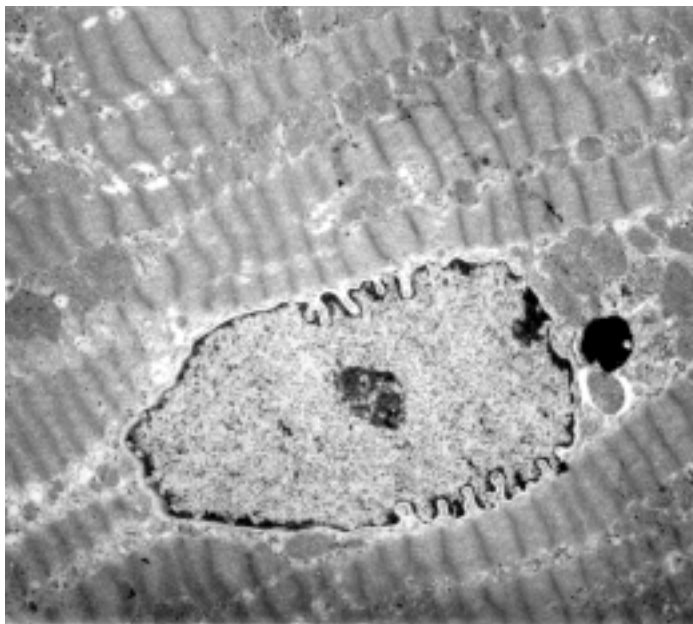
3.1.3.1. Kontrollgruppe

In zentraler Position inmitten des Sarkoplasmas befanden sich die Kerne der Myozyten der Patienten mit normalem linken Ventrikel.

Eingefügt ohne das Vorhandensein von strukturlosen Zytoplasmaanteilen zwischen ihm und den umgebenden Zellorganellen lag der Kern in den Myozyten.

Nur selten hatten einzelne Kerne einen organellenfreien Hof um ihre Membran, dessen Bedeutung noch besprochen werden wird.

Lipofuscingranula wurden in Kernnähe aufgefunden (s. Abb. 5).



*Abb. 5: Kontrollpatient
Längsovaler Kern eingefügt in
Myofibrillen, Mitochondrien und
Zellorganellen ohne Vorhandensein
von strukturlosem Zytoplasma.
x 29700*

3.1.3.2. DCM-Patientengruppe

Die Kerne der Myozyten befanden sich in zentraler Position in der Zelle, umgeben von Myofibrillen und sarkoplasmatischen Organellen.

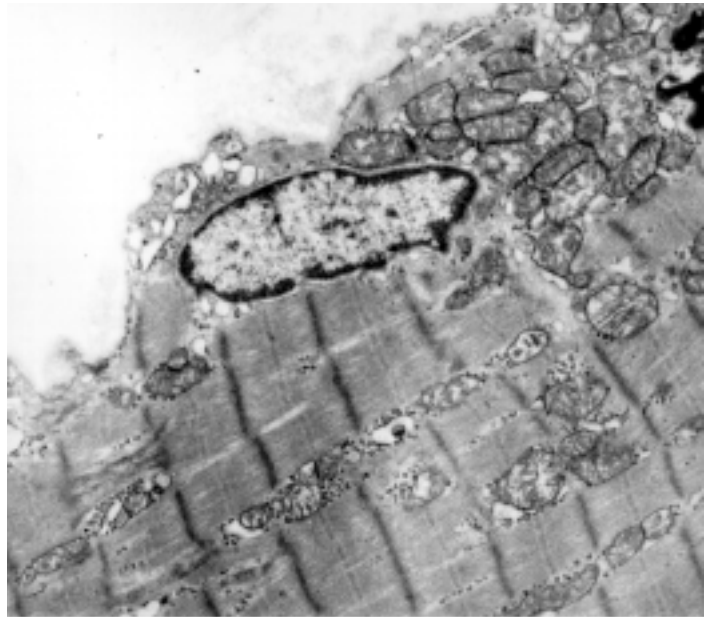
Einzelne Kerne konnten in exzentrischer und dezentraler Position aufgefunden werden in unmittelbarer Nähe zum Sarkolemm (s. Abb. 6a).

An einem Pol der Kerne befand sich ein myofibrillenfreier Hof, in dem eine Vielzahl von kleinen Mitochondrien beobachtet wurde.

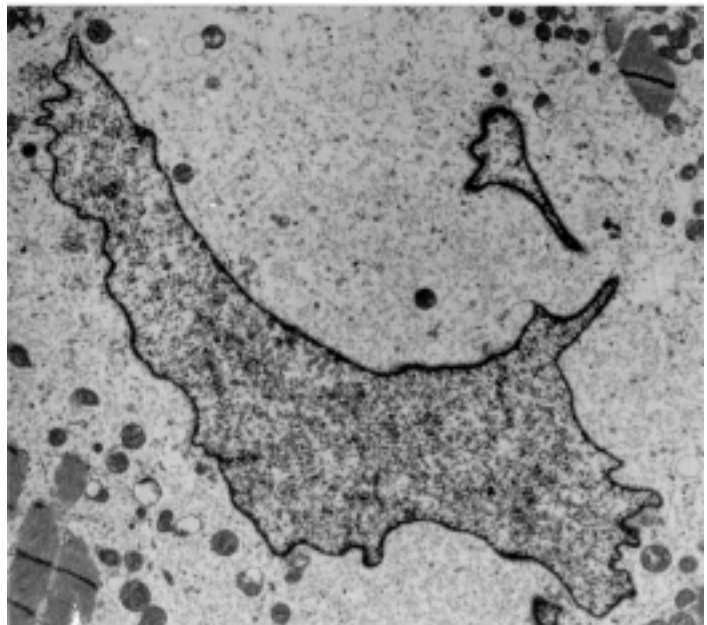
Lipofuscingranula kamen zwischen den Mitochondrien vor.

Auffallend war, daß gehäuft Kerne auftraten, deren kernumgrenzende Zone aufgeweitet war. In diesem Areal wurden nur vereinzelt Zellorganellen aufgefunden, in Form von Golgikomplex und sarkoplasmatischem Retikulum. Mitochondrien traten nur wenige in Erscheinung. Einzelne Vesikel lagen in der kernumgrenzenden Zone (s. Abb. 6b).

*Abb. 6a: DCM-Patient
Kern in Sarkolemmnähe, Myofila-
mente und Organellen direkt
angrenzend an die Kernmembran.
x 46200*



*Abb. 6b: DCM-Patient
Aufweitung des perinukleären
Areales mit nur geringer Anzahl von
Organellen in diesem Bereich.
x 19800*

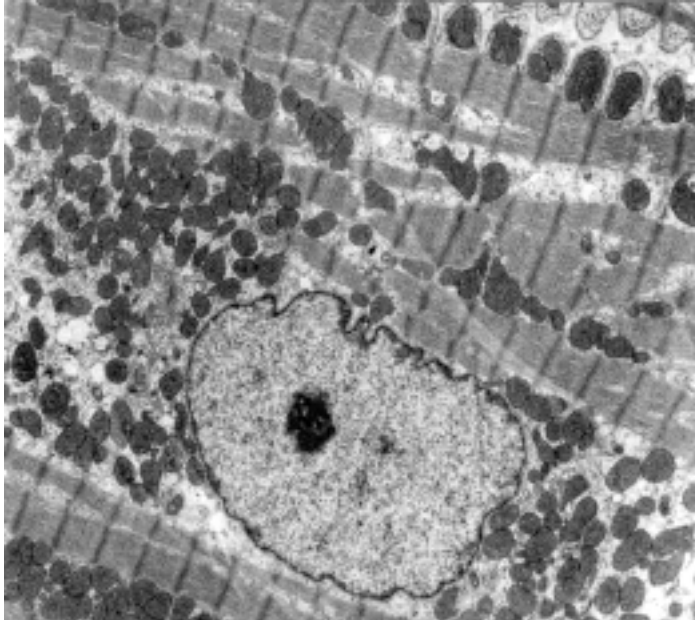


3.1.4. Chromatinverteilung

3.1.4.1. Kontrollgruppe

Die Gleichmäßigkeit der Chromatinverteilung innerhalb der Kerne der Patienten der Kontrollgruppe war offensichtlich.

Fein granuläre Anteile des Chromatins – Heterochromatin - befanden sich angeschmiegt an die innere Kernmembran. Kleinere Flächen von kondensiertem Heterochromatin verteilten sich gleichmäßig über das Nukleoplasma (s. Abb.7).



*Abb. 7: Kontrollpatient
Gleichmäßige Chromatinverteilung
über den gesamten Kern bei geringer
Margination im Bereich der inneren
Kernmembran, deutlich ausgebil-
deter Nukleolus. x 19800*

3.1.4.2. DCM-Patientengruppe

Die Chromatinverteilung der Kerne bei der DCM-Patientengruppe variierte stark.

3.1.4.2.1. Reguläre Chromatinverteilung

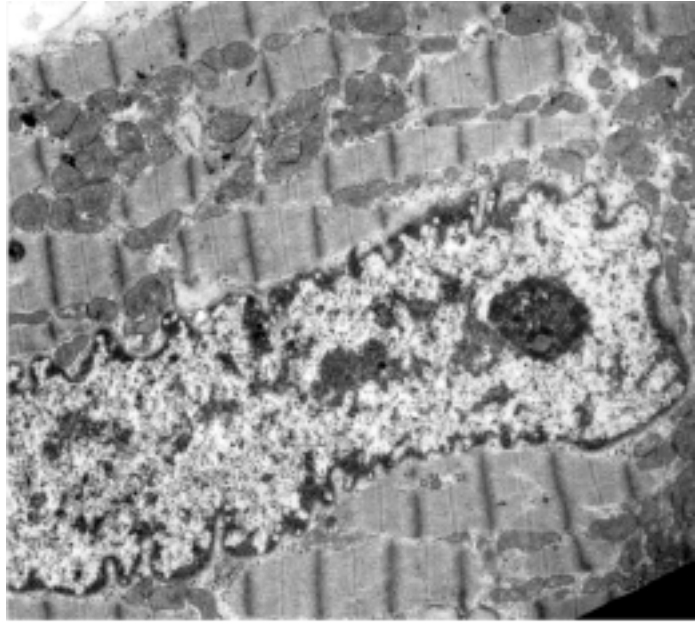
Die Mehrzahl der Kerne wies im Nukleoplasma zu mehreren Zentren konfluierendes feines granuläres Material auf, welches als Heterochromatin gedeutet wurde. Zusätzlich kam es im Bereich der inneren Kernmembran zur randständigen Ansammlung von Heterochromatin unter Freihaltung der durch Kernporen unterbrochenen Membrananteile.

Die restlichen Nukleoplasmaanteile erschienen mit feinst dispers über den Kern verteiltem Chromatin, gering kontrastgebend, angefüllt (s. Abb. 8).

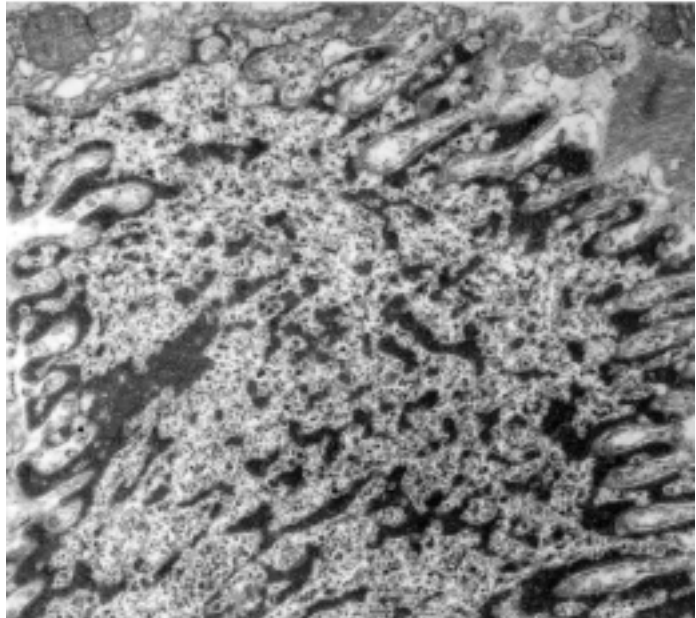
3.1.4.2.2. Chromatinaggregation

Daneben wurden Kerne nachgewiesen, deren Heterochromatin zu zahlreichen Verschmelzungsherden konfluerte. Eine Abgrenzung zu den Nukleoli des Kernes war kaum möglich. Es lag eine deutliche Margination des Heterochromatins im Bereich der inneren Kernmembran vor (s. Abb. 9).

*Abb. 8: DCM-Patient
Reguläre Chromatinverteilung
gleichmäßig über den Kern, mit
marginalem Chromatin im Bereich
der inneren Kernmembran, Chroma-
tincenter über den Kern verteilt und
nukleolusassoziiertem Chromatin,
intranukleoläres Chromatin einge-
schlossen im Nukleolus, bemerkens-
wert: Perichromatingranula.
x 29700*



*Abb. 9: DCM-Patient
Aggregationen von stark kontrast-
gebendem Heterochromatin, deut-
liche Margination des Chromatins
im Bereich der inneren Kern-
membran, bemerkenswert: Peri-
chromatingranula. x 66000*



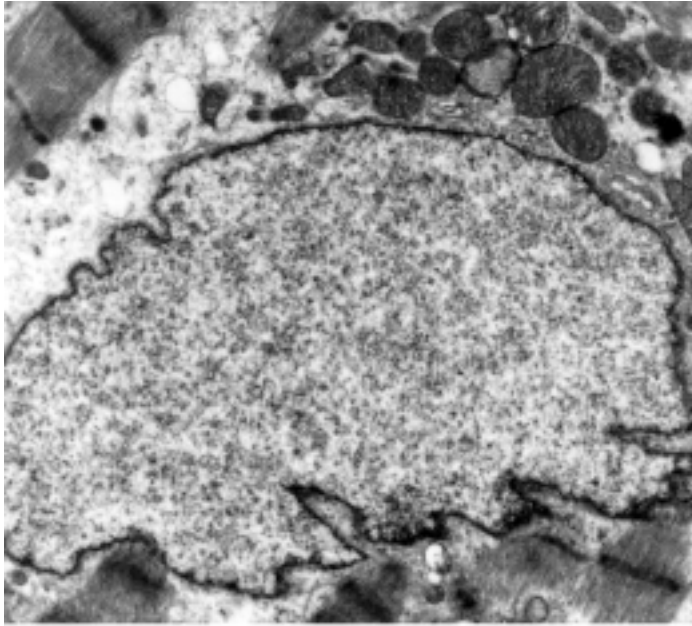
3.1.4.2.3. Kontrastarme Kerne

Im Gegensatz hierzu gab es sehr gleichmäßige, homogene und kontrastarme Kerne ohne jegliche Areale mit kondensiertem, kontrastreichem Heterochromatin. Es kam auch nur äußerst gering zur Membranständigkeit dieses Chromatins (s. Abb. 10a).

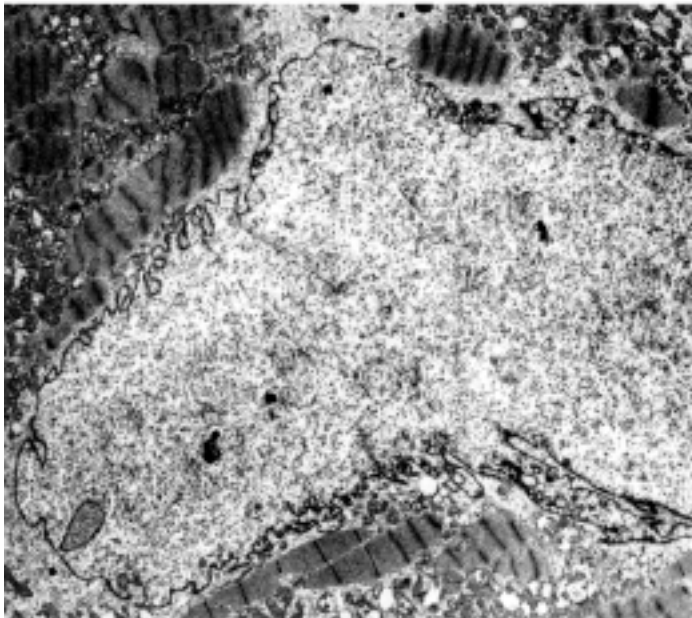
Trotz ausgedehnter Kerngröße waren nur selten Nukleoli angeschnitten, die auch nur von geringer Größe waren (s. Abb. 10b).

3.1.4.2.4. Ischämie

Einzelne Kerne, deren Chromatin regelrecht verklumpt erschien und die keine gleichmäßige feingranuläre Heterochromatinverteilung über die gesamte Kernfläche aufwiesen, wurden nachgewiesen.



*Abb. 10a: DCM-Patient
Kontrastarmer Kern mit gleich-
mäßiger Chromatinverteilung ohne
Aggregation, nur geringe Margi-
nation des Chromatins im Bereich
der inneren Kernmembran.
x 46200*



*Abb. 10b: DCM-Patient
Kontrastarmer Kern mit sehr
gleichmäßiger Chromatinverteilung
und nur sehr kleinen Nukleoli im
Verhältnis zum großen Kern.
x 13200*

Das Heterochromatin war im Bereich der inneren Kernmembran randständig zur schwarzen Masse verschmolzen.

Der gesamte Kern war sehr kontrastreich.

Die restlichen Nukleoplasmaanteile wirkten frei und entleert von Kernstrukturen. Zusätzlich wiesen die Mitochondrien hier eine deutliche Cristaeverringerng und Aufhellung der Mitochondrienmatrix auf (s. Abb. 11).

3.1.4.2.5. Apoptose

Ein mit geringer Häufigkeit auftretendes Phänomen waren die regelmäßige Verteilung des Chromatins über die Kernfläche und geringe Margination des Chromatins bei gleichzeitigem Auftreten einer großflächigen Aggregation von stark kontrastgebendem Chromatin in einem Areal des Kernes. Diese aggregierten Areale

waren immer, zumindest in Anteilen, mit dem marginalen Heterochromatin in Verbindung. Diese Areale nahmen etwa eine fünftel bis ein zehntel der angeschnittenen Kernfläche ein (s. Abb.12).

Abb. 11: DCM-Patient

Ischämie, Chromatin erscheint verklumpt und in Arealen verschmolzen, nukleäre Matrix wirkt entleert, Mitochondrien weisen Verringerung der Cristae bei Aufhellung der mitochondrialen Matrix auf.

x 19800

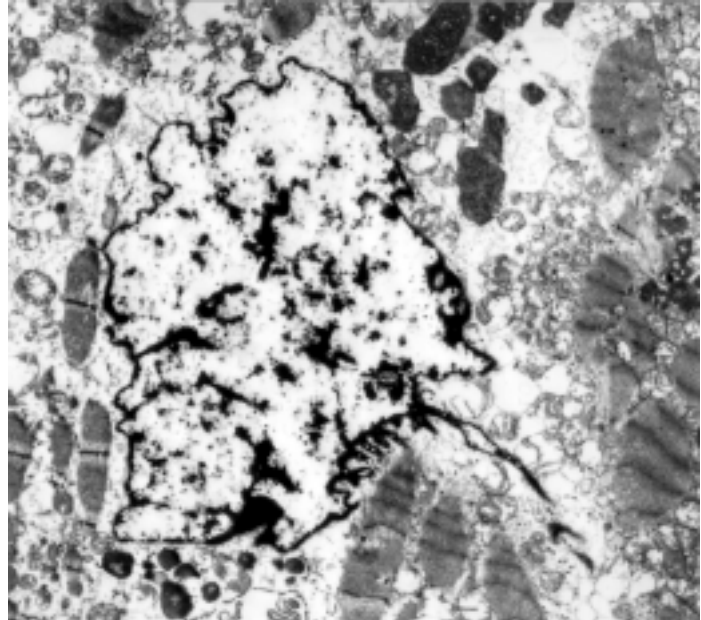
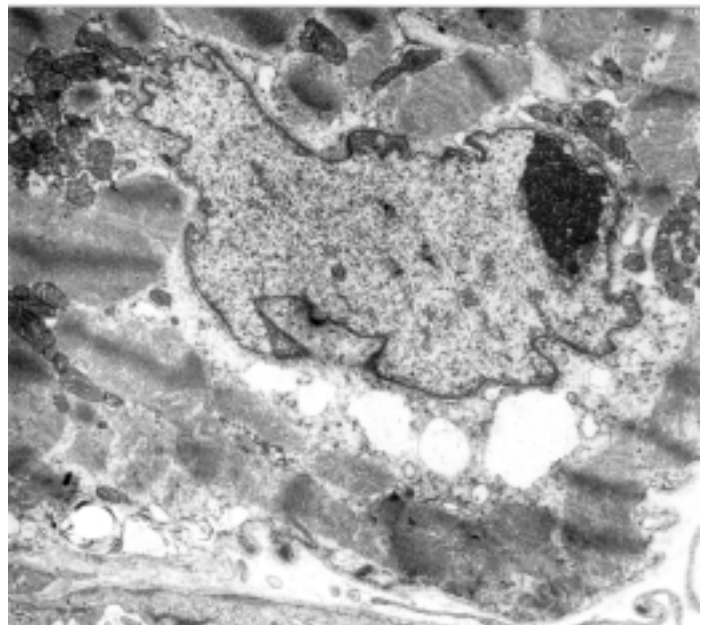


Abb. 12: DCM-Patient

Apoptose, Aggregation von Chromatin in einem Kernareal direkt angrenzend an die innere Kernmembran, sonst geringe Margination und homogene Verteilung des Chromatins über die Kernfläche, Mitochondrien intakt.

x 29700

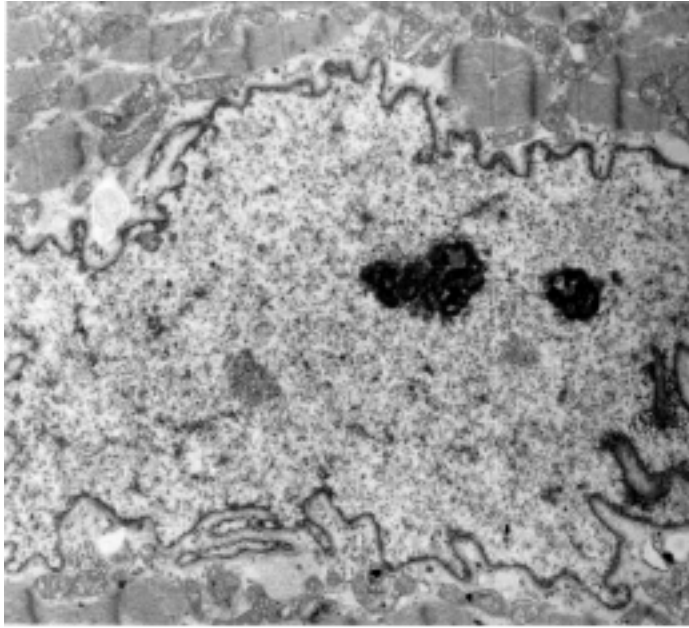


3.1.4.2.6. Perichromatingranula

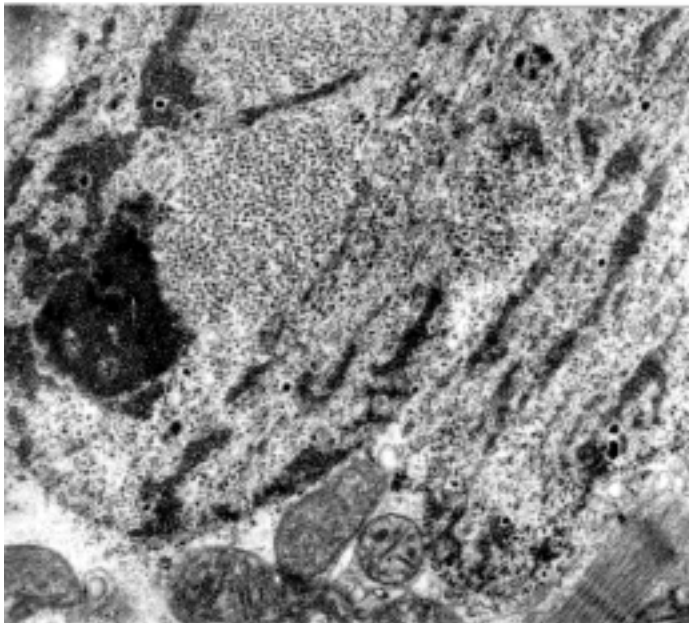
Unabhängig von der Chromatinverteilung im Nukleoplasma fanden sich innerhalb der heterochromatinreichen Matrix zyklische Strukturen, die von einem kleinen Hof frei von Chromatin umgeben waren.

Diese Körnchen waren deutlich größer im Querschnitt als die sie umgebenden Matrixbestandteile.

Es handelte sich hierbei um Perichromatingranula (s. Abb. 13a, 13b).



*Abb. 13a: DCM-Patient
Perichromatingranula in großer
Anzahl, auch Ansammlungen von
Perichromatingranula innerhalb
nukleärer Matrix. x 29700*



*Abb. 13b: DCM-Patient
Perichromatingranula mit deut-
licher Hofbildung, bemerkenswert:
keine Kernmembran in diesem
Kernabschnitt. x 99000*

3.1.4.2.7. Interchromatingranula

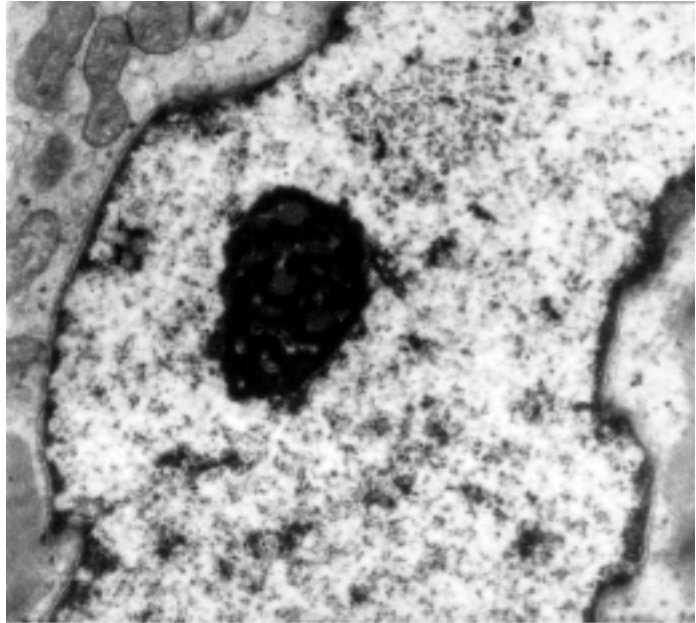
Außerdem sammelte sich stark kontrastgebendes und kantiges Material zwischen den kontrastärmeren Chromatinanteilen in dem Nukleoplasma zu herdförmigen Arealen an. Es war in der Größe chromatinähnlich.

Dieses Material wurde aufgrund der Charakteristika als Interchromatingranula identifiziert.

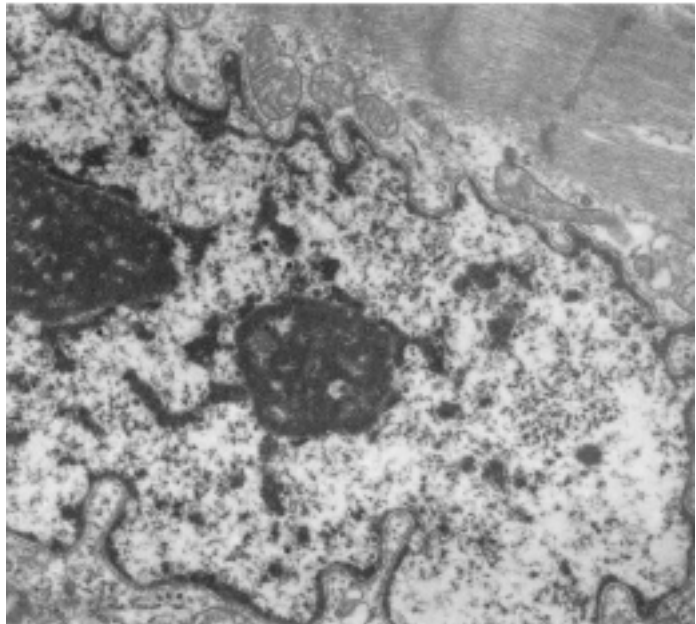
Peri- und Interchromatingranula kamen nebeneinander vor (s. Abb. 14a, 14b).

Kerne, die außer diesen Granula noch feine, kleine, diffus im Nukleoplasma gleichmäßig verteilte, rundliche Strukturen, kleiner als Perichromatingranula, aufwiesen, wurden aufgefunden.

*Abb. 14a: DCM-Patient
Interchromatingranula und einzelne
Perichromatingranula, Kern sehr
kontrastreich, Nukleolus kompakt,
dessen Komponenten nur bedingt zu
unterscheiden. x 66000*



*Abb. 14b: DCM-Patient
Interchromatingranula und Peri-
chromatingranula. x 66000*



3.1.5. Kernmembran

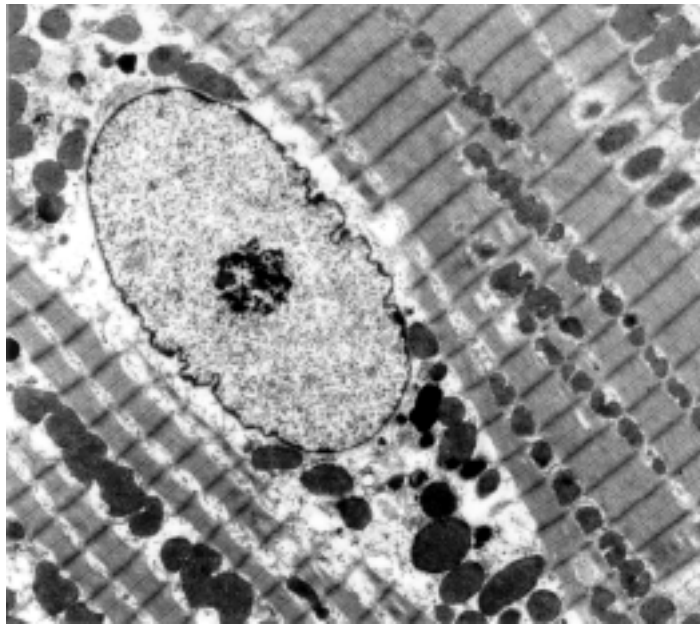
3.1.5.1. Kontrollgruppe

Die Kernmembran verlief ohne deutliche Einziehungen um das Nukleoplasma und separierte dabei die Chromatinanteile und das übrige Nukleoplasma vom Sarkoplasma.

Die äußere und innere Kernmembran schlossen die perinukleäre Zisterne zwischen sich ein.

Beide verschmolzen teilweise, um eine Kernpore zu bilden.

Die äußere Membran war besetzt mit Ribosomen, die innere Membran war begleitet von der fibrösen Lamina, der die Heterochromatinanteile des Chromatins angeheftet waren (s. Abb. 15).



*Abb. 15: Kontrollgruppe
Kernmembran verläuft regelmäßig,
nur geringe Einziehungen. $\times 19800$*

3.1.5.2. DCM-Patientengruppe

Bei den an DCM erkrankten Patienten traten deutliche Veränderungen der Kernmembran auf.

3.1.5.2.1. Membranverlauf

Es kamen durch die bereits dargestellte Formvarianz der Kerne große Ausstülpungen der Membran vor. Neben diesen zur Vielfalt der Formen beitragenden Membranverläufen war die Kernmembran von multiplen, kleinen wellenförmigen Aussackungen überzogen (s. Abb. 13a, 14b). Nur selten kamen Kerne mit glattwandigen Membranen zur Darstellung.

3.1.5.2.2. Pseudoeinschlüsse

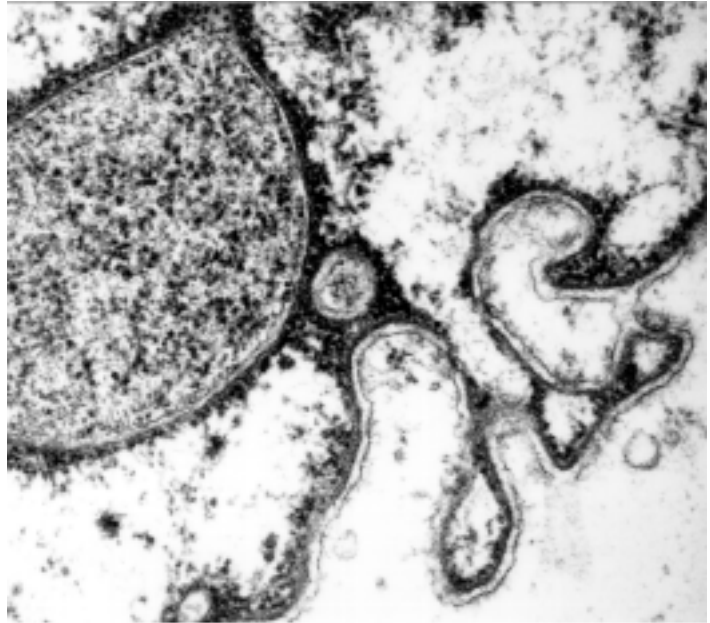
Bedingt durch diese Windungen wurden Lakunen und Buchten gebildet, und es wurden gehäuft sarkoplasmatisches Material und Myozytenorganellen in den Kern eingeschlossen.

Es werden diese Erscheinungen im folgenden als Pseudoeinschlüsse bezeichnet.

Diese Pseudoeinschlüsse waren membranös vom Nukleoplasma separiert und traten mit runder oder seltener mit ovaler Form auf (s. Abb. 16a, 16b).

Häufig kamen sie in den submembranösen Arealen des Kernes vor.

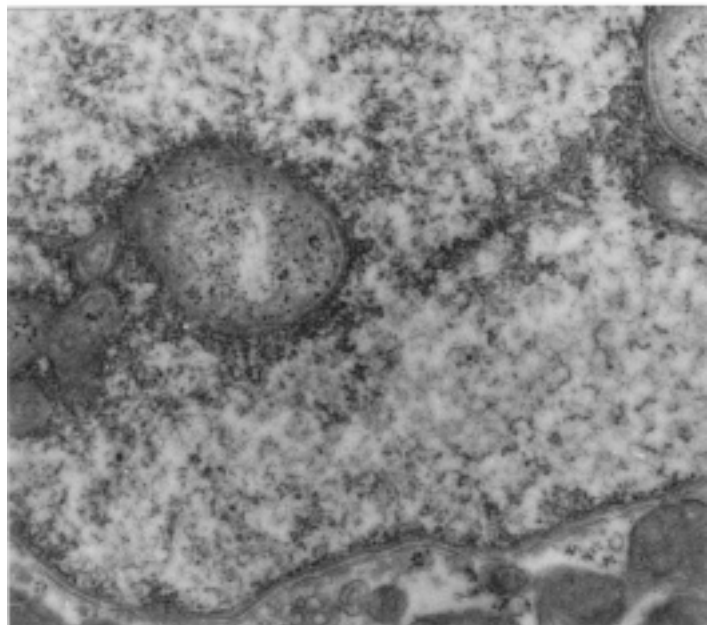
*Abb. 16a: DCM-Patient
Faltungen der Kernmembran führen
zu Pseudoeinschlüssen, Entstehung
eines solchen zu erkennen neben
großem Pseudoeinschluß.
x 198000*

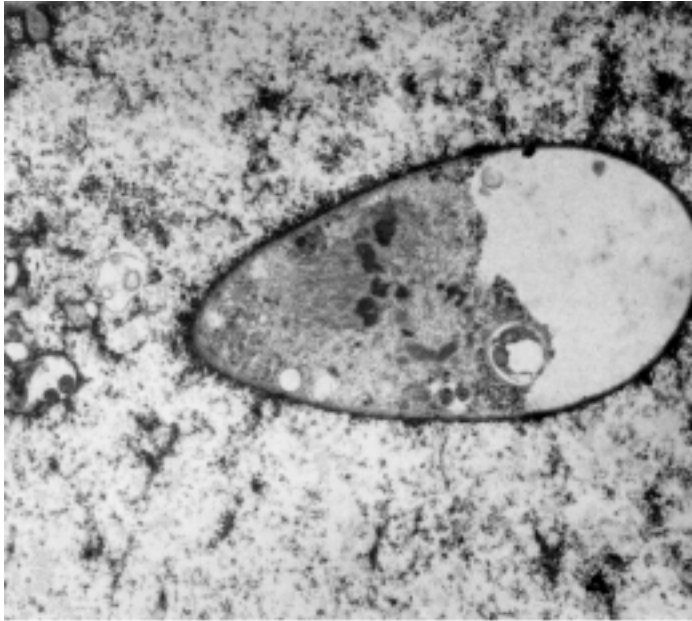


*Abb. 16b: DCM-Patient
Detailaufnahme von Abb. 16a.
x 297000*

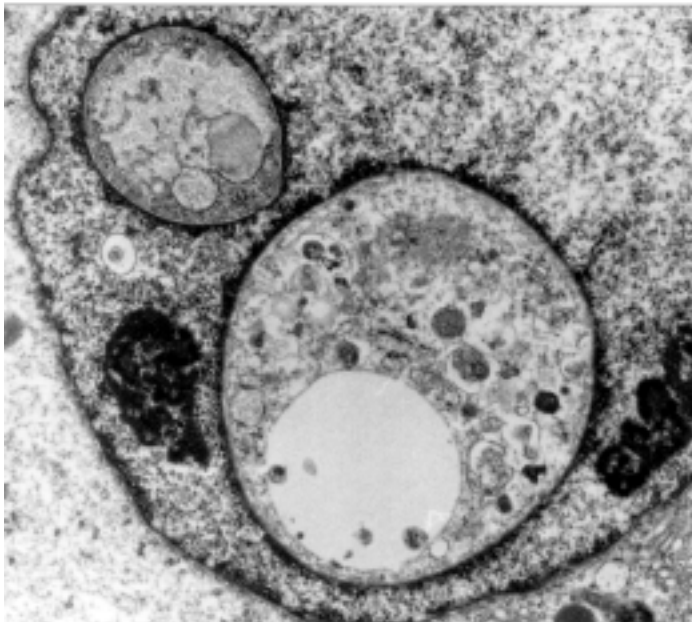


*Abb. 16c: DCM-Patient
Aneinanderreihung von Pseudo-
einschlüssen führt quasi zur Ab-
trennung von Kernarealen, Pseudo-
einschlüsse scheinen zu konfluieren.
x 132000*

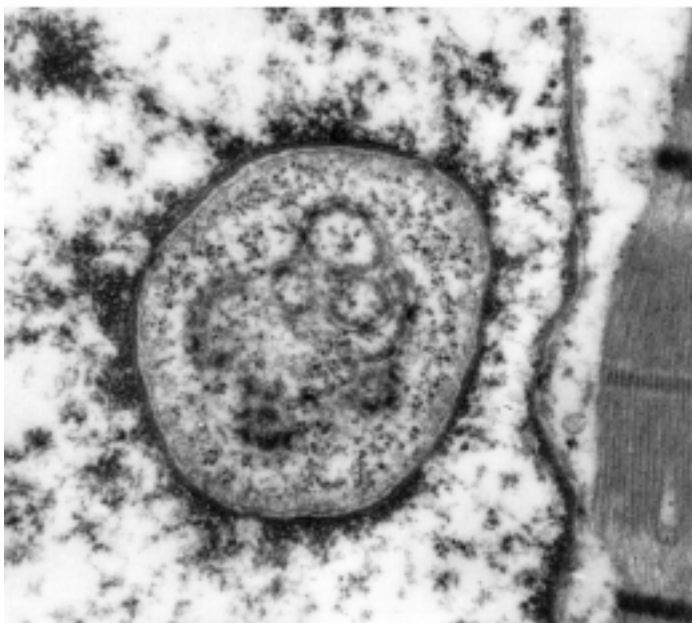




*Abb. 16d: DCM-Patient
Großer Pseudoeinschluß mit Einschluß von Myofibrillen, Mitochondrien und anderen sarkoplasmatischen Organellen, bemerkenswert: Vakuolen und hohlraumbildendes System in nukleärer Matrix.
x 46200*



*Abb. 16e: DCM-Patient
2 große Pseudoeinschlüsse geben dem Kern ein ringähnliches Erscheinungsbild, Zellorganellen und Vakuole eingeschlossen, Nukleoli erscheinen an den Rand gedrängt.
x 46200*



*Abb. 16f: DCM-Patient
Pseudoeinschluß mit klarer Begrenzung: Margination des Heterochromatins im Außenbereich, Lamina und innere Kernmembran als äußere Begrenzung des Pseudoeinschlusses und äußere Kernmembran als innere Begrenzung des Pseudoeinschlusses zum Einschlußinhalt/Sarkoplasma, Kernpore zu erkennen.
x 132000*

Die äußere Membran des Pseudoeinschlusses stand in Kontakt mit dem nukleären Chromatin und stellte die innere Kernmembran dar, die innere Membran des Einschlusses war im Kontakt mit dem Einschlußinhalt und stellte die äußere Kernmembran dar. Die Membranen begrenzten die perinukleäre Zisterne.

Die direkt im Bereich der Membran und damit in den Außenbereichen des Kernes auftretenden Pseudoeinschlüsse schlossen volumenmäßig geringe Zytoplasmaanteile ein. Hingegen waren die zentral in der Kernfläche aufgefundenen Pseudoeinschlüsse großflächiger, und es kam bei dem umschließenden Kernareal zu einem ringähnlichen Erscheinungsbild.

Verschiedene Zellorganellen wurden in den Pseudoeinschlüssen aufgefunden.

Abhängig von der Größe wurden unspezifisches sarkoplasmatisches Material oder Myofibrillen und kontraktiles Material, Mitochondrien und Vakuolen eingeschlossen (s. Abb. 16c, 16d, 16e, 16f).

Benachbarte Pseudoeinschlüsse bildeten stellenweise kettengleiche Strukturen, die ganze Kernanteile zu separieren schienen (s. Abb 16c).

Einschlüsse, die keinerlei Membranabtrennung zum umgebenden Kernareal aufwiesen, werden noch im folgenden beschrieben und diskutiert werden als eigenständiges pathologisches Phänomen der Kerne bei DCM.

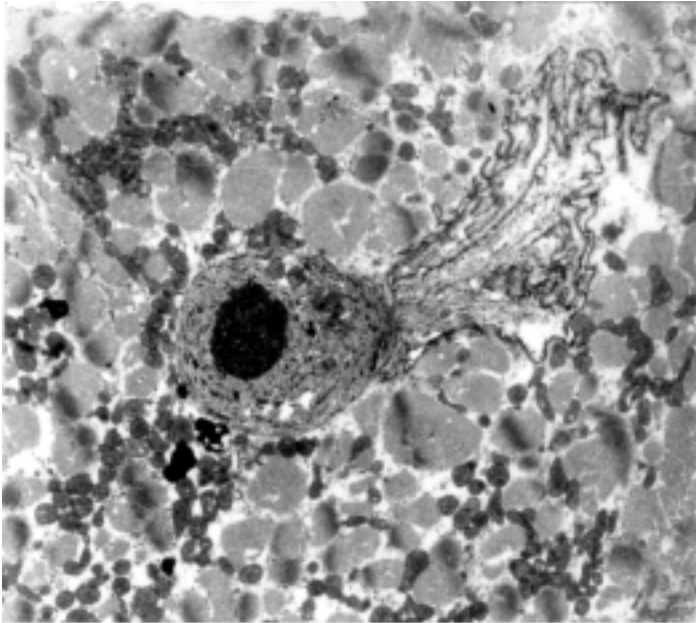
3.1.5.2.3. Unterbrochene Kernmembran

Es kam zu dem seltenen Bild, daß die Kernmembran, die das Nukleo- vom Sarkoplasma separiert, in Teilen nicht nachweisbar war (s. Abb. 17a, 17b, 17c, 17d, 17e).

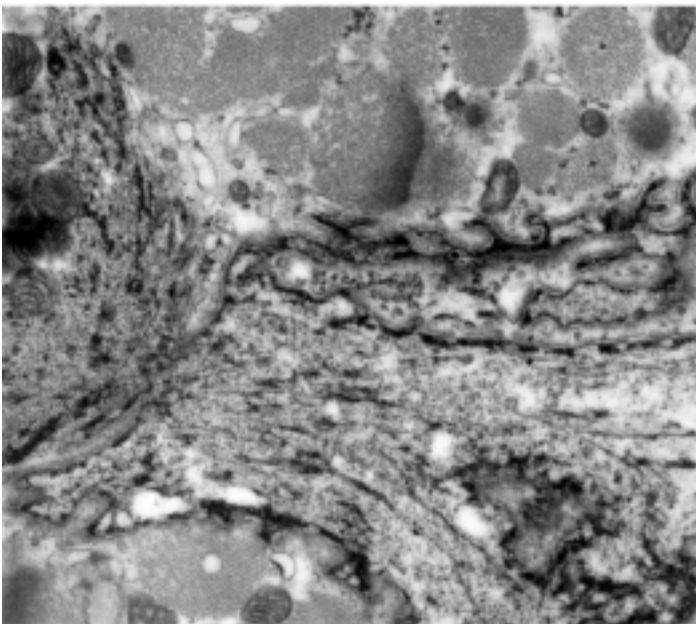
Bei dem bereits erwähnten Kern mit kometenartigem Erscheinungsbild waren die schweifartigen Kernanteile mit zwar äußerst gewundener, aber doch deutlicher Kernmembran mit typischem Aufbau umkleidet. Die Membran verlor sich aber und endete abrupt im Bereich des Ansatzpunktes des „Kernschweifes“ an den rundlichen „Kernkörper“. Das Chromatin, welches einen großen Nukleolus einschloß, lag frei im Sarkoplasma. Die Zellorganellen, wie Mitochondrien und Myofibrillen, grenzten direkt an (s. Abb. 17 a, 17b).

Ein weiterer großer längsovaler Kern (über die Länge von 22 Sarkomeren) wies ein solches Fehlen der nukleären Membran an einem Pol des Kernes auf. Der größte Teil des Kernes war membranös umschlossen, und nur ein Pol wies keine Separierung zum Nukleoplasma auf. Die Membranhülle endete abrupt ohne sonstige Veränderung des Nukleoplasmas oder erkennbare Alterationen des Sarkoplasmas und der Zellorganellen. Einzig das vorher direkt der inneren Membran und Lamina

angeschmiegte Heterochromatin fehlte im Bereich der membranfreien Kernabschnitte. Wie bei der obigen Veränderung lagen auch hier die Zellorganellen im direkten Kontakt zum Nukleoplasma und Chromatin (s. Abb. 17e).

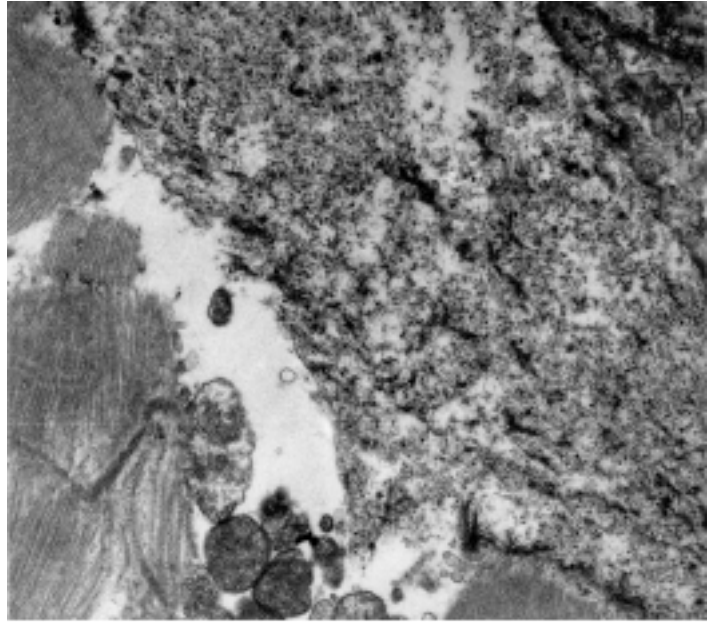


*Abb. 17a: DCM-Patient
Kometenartiger Kern, im Bereich des „Kometenkörpers“ fehlt die Kernmembran, der „Kometenschweif“ ist membranös separiert, bemerkenswert: intranukleäre Mitochondrien und großer Nukleolus. x 19800*

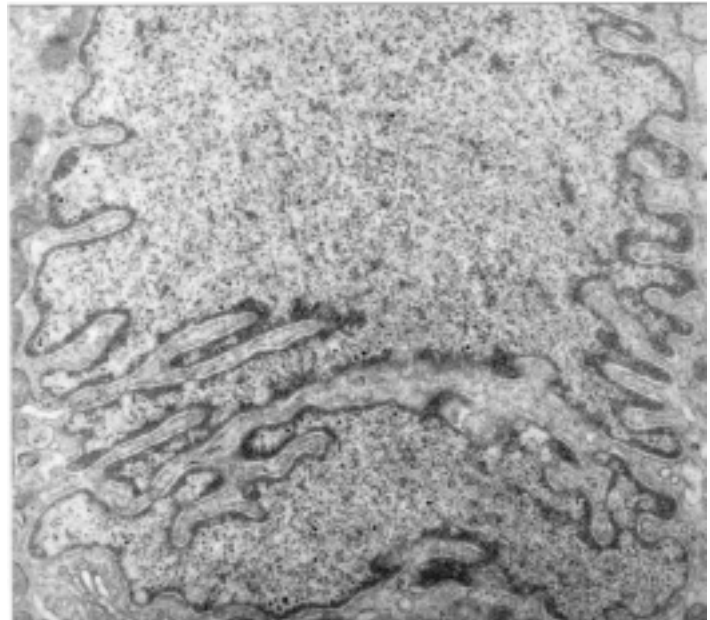


*Abb. 17b: DCM-Patient
Detailaufnahme von Abb. 17a, deutlich zu erkennen die Membranhülle des „Kometenschweifes“ und das Verschwinden der Membran im Bereich des „Kometenkörpers“. x 66000*

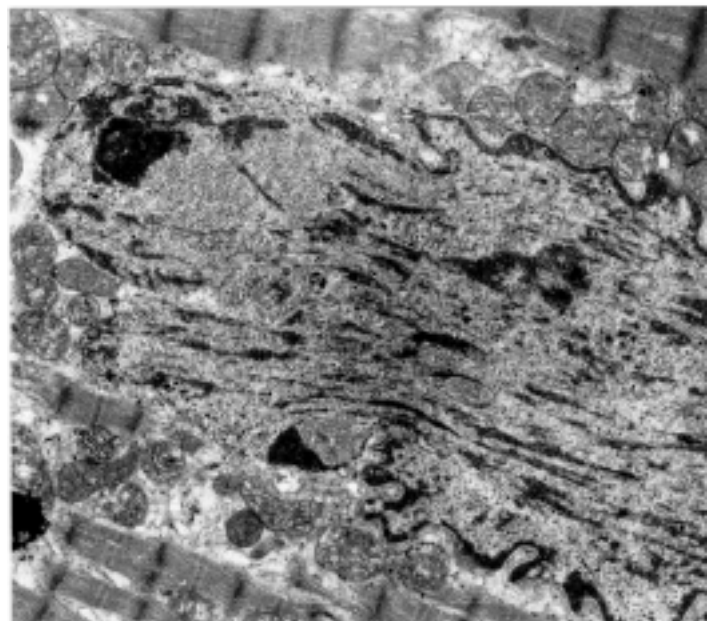
*Abb. 17c: DCM-Patient
Keine Kernmembran zwischen
Nukleo- und Sarkoplasma in
kurzem Abschnitt eines Kernes.
x 66000*



*Abb. 17d: DCM-Patient
Zwischen zwei Kernanschnitten
Doppelmembran nicht vollständig
ausgebildet, obwohl sarkoplasma-
tisches Material zwischen den
Anschnitten zu liegen kommt.
x 66000*



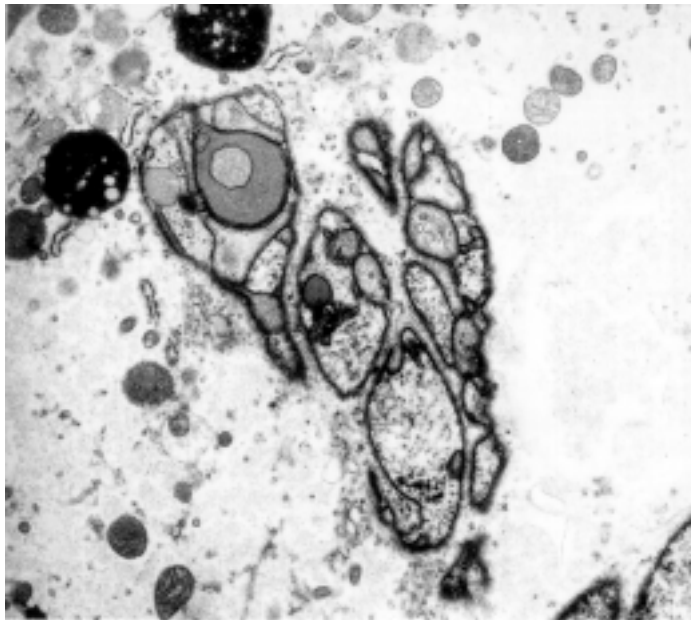
*Abb. 17e: DCM-Patient
Fehlende Membran im Bereich eines
Kernpoles ohne Alteration der
anderen Strukturen, bemerkenswert:
Perichromatingranula. x 46200*



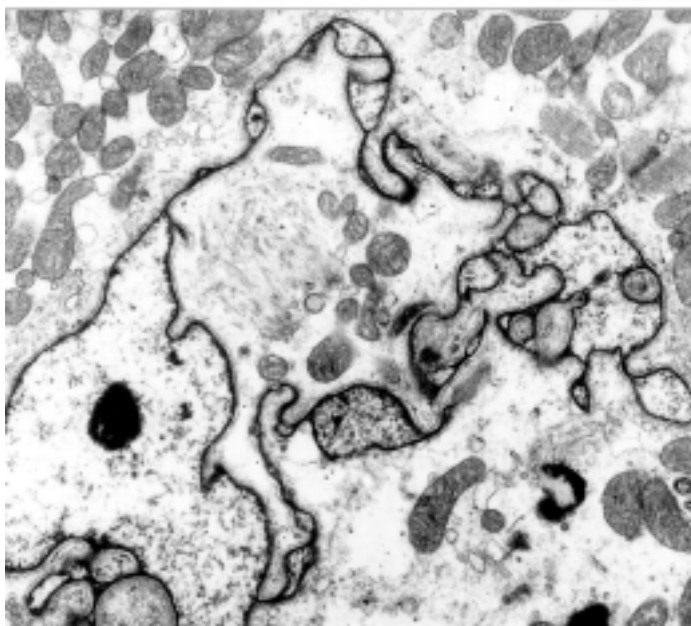
3.1.5.2.4. Brückenbildung durch die Kernmembran

Bei der Darstellung der Formenvarianz der Kerne wurde eine weitere Membranauffälligkeit kurz erwähnt, die hier nun detaillierter besprochen werden soll.

Es wurden Brückenbildungen nur durch Membranbestandteile als Verbindungsglieder zwischen multiplen Kernfragmenten beobachtet. Diese Brücken schlossen keine Nukleoplasmaanteile mehr ein und verschmolzen zu einem Komplex bestehend aus äußerer Kernmembran, innerer Membran, Lamina, innerer und wieder äußerer Membran. In unregelmäßigen Abständen wurde dieser Komplex aufgeschlossen, und es lagen erneut Chromatinanteile interlaminär. In diesen Arealen tauchten auch noch zusätzlich Pseudoeinschlüsse auf als Hinweis auf die starke Oberflächenunregelmäßigkeit der Kerne (s. Abb. 18a, 18b).



*Abb. 18a: DCM-Patient
Brückenbildung durch die Kern-
membran bei gleichzeitigem Auf-
treten von Pseudoeinschlüssen und
Einschluß von fein filamentärem
Material. x 46200*



*Abb. 18b: DCM-Patient
Brückenbildungen durch Kern-
membranen mit ampullenartigen
Aufweitungen bei gleichzeitigem
Auftreten von Pseudoeinschlüssen
und Einschlüssen. x 46200*

3.1.5.2.5. Intranukleäre Tubuli

Neben den bereits dargestellten Alterationen der Kernmembran trat eine weitere bemerkenswerte Membranveränderung auf.

In Arealen mit starken Fältelungen und Pseudoeinschlüssen lagen intranukleär tubuläre Strukturen, die meist in Ansammlungen auftraten.

Die tubulären Strukturen konnten geradlinig verlaufen, es kamen abgewinkelte und U-förmig geschwungene Tubuli neben konzentrischen Tubulianschnitten vor. Häufig traten mehrere Formen nebeneinander auf und waren auf einzelne Kernabschnitte begrenzt. Die Tubuli lagen submembranös und standen an einzelnen Stellen mit der inneren Kernmembran, von der sie gebildet wurden, direkt in Verbindung.

Die äußeren Wände der Tubuli waren mit wandständigem Chromatin umgeben, außerdem lagen sie auch in heterochromatinreicher Matrix.

Das durch die Tubuli entstehende Lumen wurde ausgefüllt von einer fein granulären Masse und stand mit der perinukleären Zisterne in Verbindung.

Die Form der Tubuli variierte stark, geradlinige und zylindrisch geformte Tubuli kamen gehäuft im rechten Winkel zu dem zugehörigen Membranabschnitt vor. Auch bei Tubuli, die an Pseudoeinschlüssen angrenzten, wurde dies beobachtet.

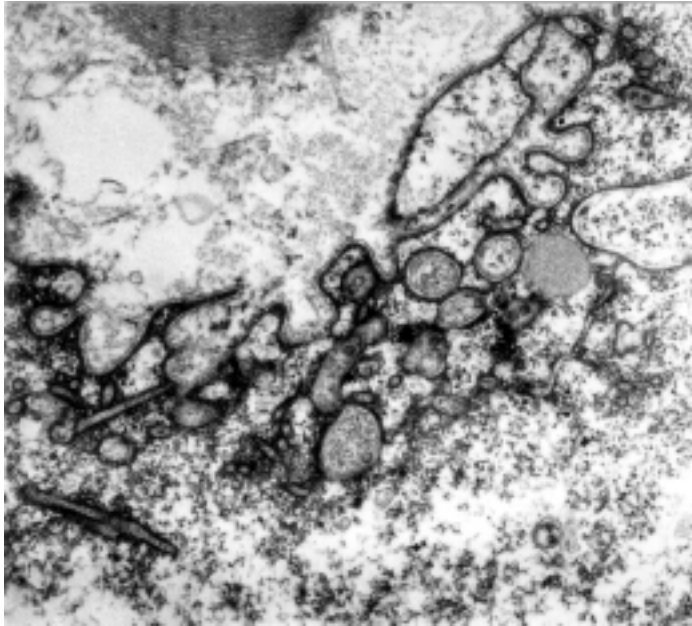
Einige konzentrische Tubuli lagen gleichzeitig diffus in diesen Bereichen.

Stark gebogene und zum „U“ geformte Tubuli traten auf.

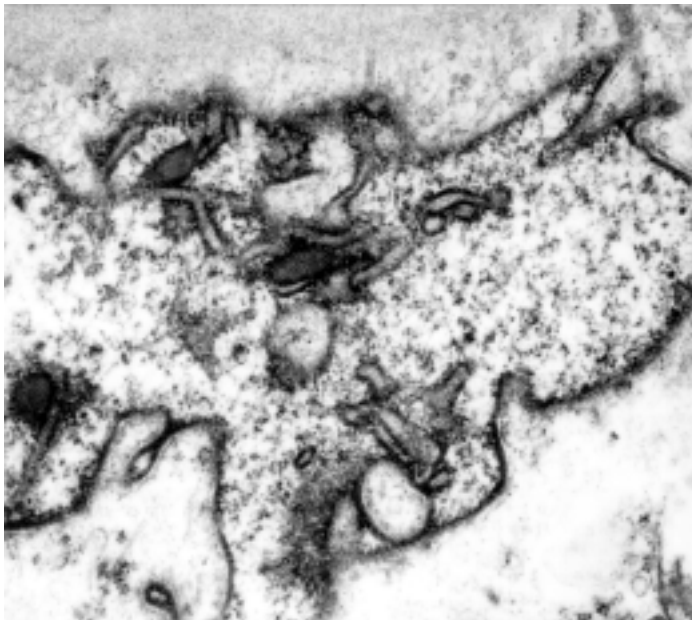
Vereinzelt wurden ringförmige Tubuli aufgefunden (s. Abb. 19a, 19b, 19c, 19d, 19e, 19f).

An einem orthogonal zur Membran stehenden Tubulus wurden acht konzentrische Strukturen aufgefunden, mit und ohne zentralem Knötchen, die aufgrund ihrer Größe und Morphologie an nukleäre Porenkomplexe erinnern (s. Abb. 19g).

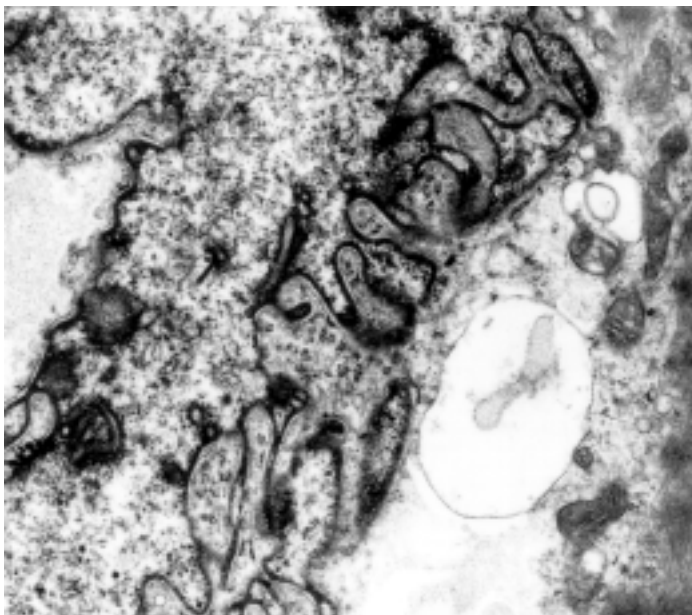
Als solitärer Befund wurde eine kettenförmige Aneinanderreihung von Tubuli direkt angeschmiegt an die nukleäre Membran aufgefunden, innerhalb des eingeschlossenen Nukleoplasmas kam zusätzlich ein Einschluß vor. Ein weiterer ringförmiger Tubulus trat in Kontakt zu dieser kettenähnlichen Struktur und lag dadurch tief im Nukleoplasma (s. Abb. 19h).



*Abb. 19a: DCM-Patient
Intranukleäre Tubuli mit zylindrischem, parallelwandigem Verlauf in Ansammlung auftretend, heterochromatinreiches Areal und Kernbereich mit vielen Pseudoeinschlüssen, zahlreiche Querschnitte durch diese Tubuli, bemerkenswert: Einschluß von filamentärem Material in nukleärer Matrix ohne membranöse Separierung. x 66000*



*Abb. 19b: DCM-Patient
Intranukleäre Tubuli in Ansammlung auftretend, in großer Formvarianz, nebeneinander zylindrische, geschwungene, V-förmige und abgeflachte U-förmige Tubuli, bemerkenswert: Kernmembran nur lückenhaft nachzuvollziehen. x 66000*



*Abb. 19c: DCM-Patient
Intranukleäre Tubuli (Längs- und Querschnitte) liegen in pseudoeinschlußreichem Kernareal. x 66000*

Abb. 19d: DCM-Patient

Inmitten nukleärer Matrix liegt eine Ansammlung von ring- und U-förmigen Tubuli, angrenzend an Einschluß aus filamentärem Material, bemerkenswert: Fragmentierung des Kernes. x 46200

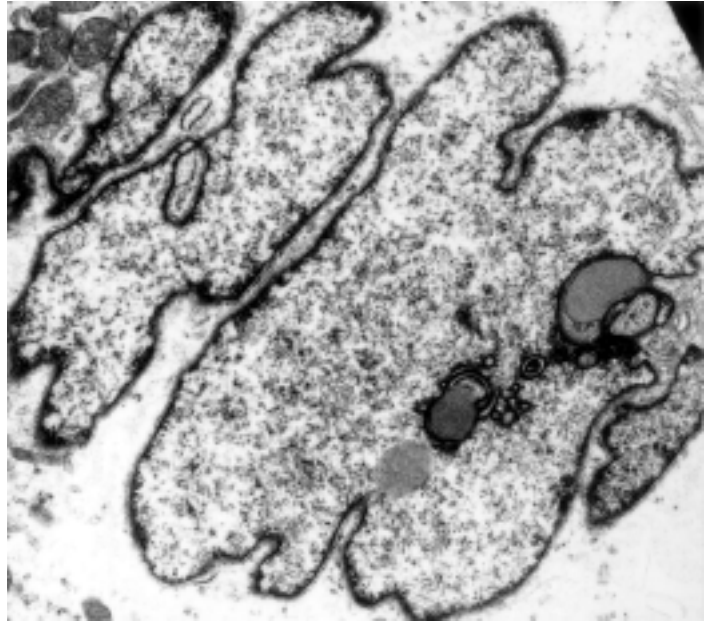


Abb. 19e: DCM-Patient

Intranukleäre Tubuli in Ansammlung als Detailaufnahme, deutlich werden die Auffüllung des Tubulilumens mit fein granulärem Material und die Heterochromatinanreicherung im Bereich der Tubuli. x 198000

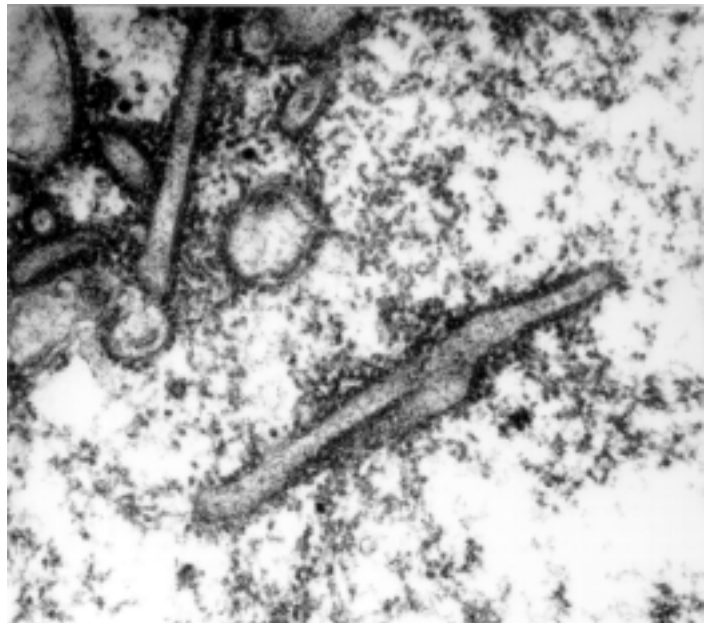
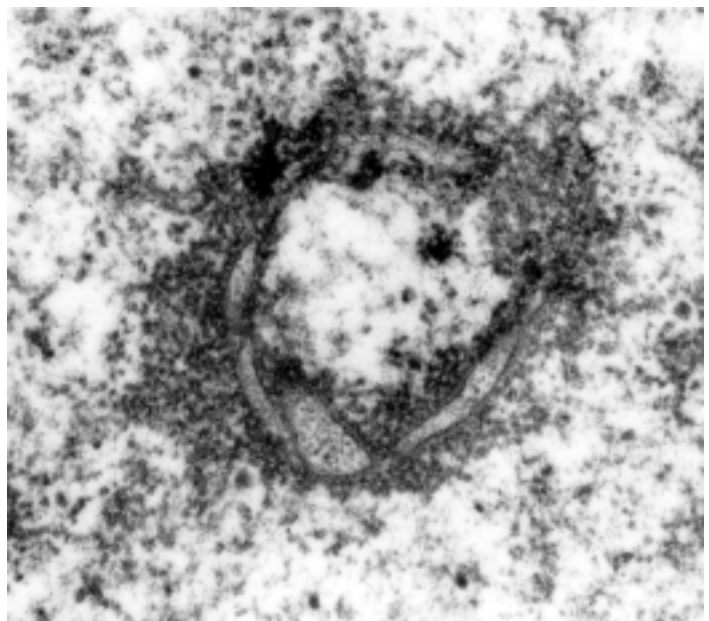
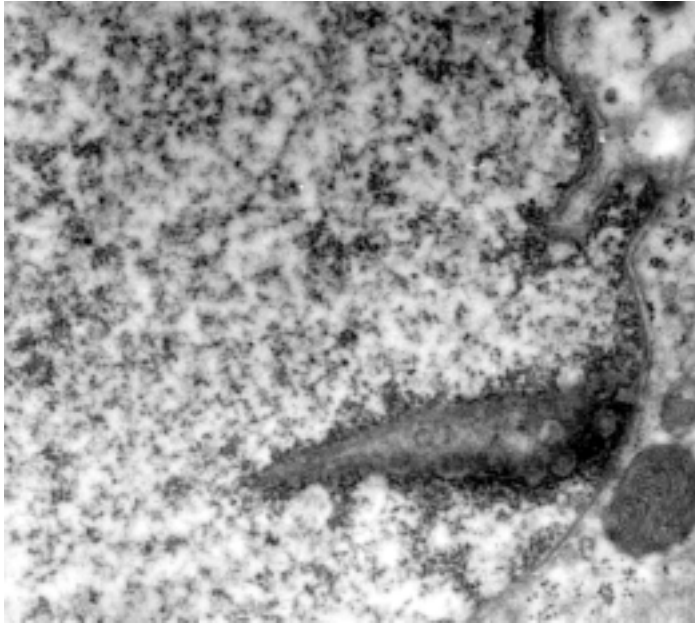


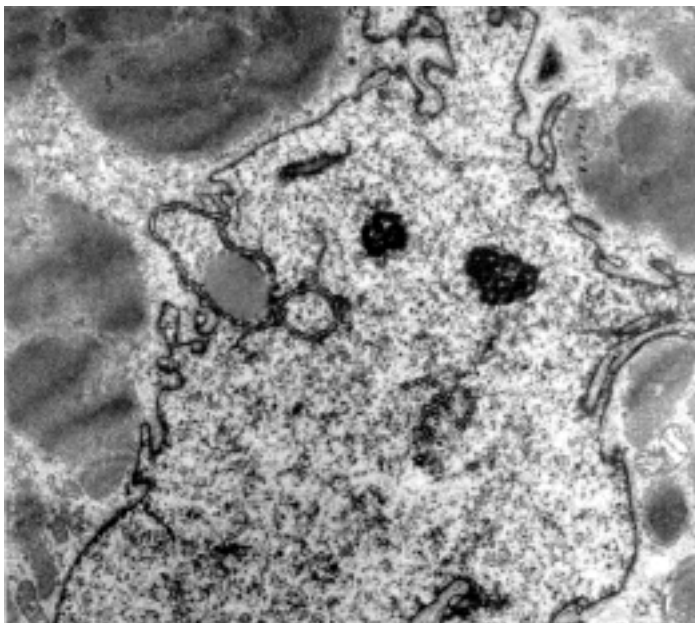
Abb. 19f: DCM-Patient

Kettenbildung von intranukleären, zylindrischen und geschwungenen länglichen Tubuli mit zirkulärer Erscheinung. Tubulilumen aufgefüllt mit fein granulärem Material. x 198000





*Abb. 19g: DCM-Patient
Intranukleärer Tubulus mit acht konzentrischen Gebilden, bei denen es sich möglicherweise um Kernporenkomplexe handelt, Tubulus steht orthogonal zu seiner ihn bildenden Membran. x 132000*



*Abb. 19h: DCM-Patient
Aneinanderreihung von zylindrischen und konzentrischen intranukleären Tubuli mit Kettenbildung, Einschluß in diesem Areal von fein filamentärem Material, keine auffällige Heterochromatinanreicherung an Tubuli. x 29700*

3.1.5.2.6. Kompartimente innerhalb des Kernes

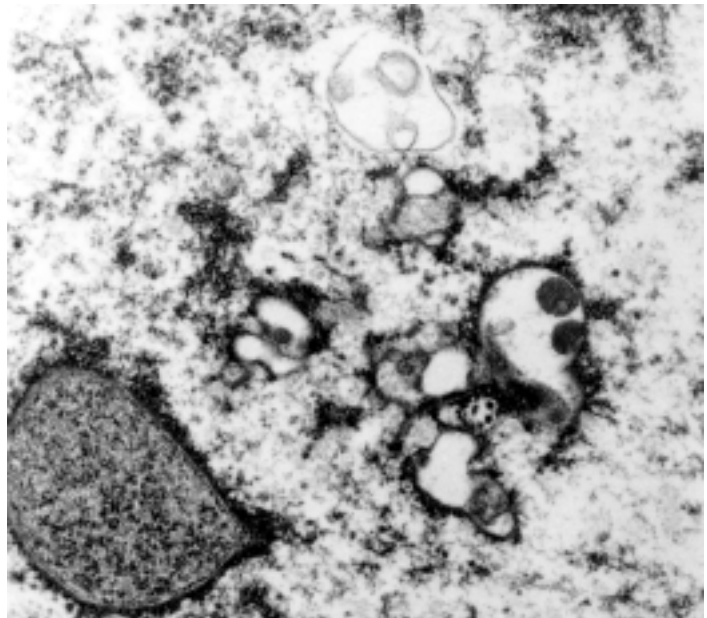
Neben diesen Tubuli kam es zur Bildung von zentral im Kern liegenden vakuolenähnlichen Hohlräumen innerhalb des Nukleoplasmas durch die innere Kernmembran, im folgenden als Kompartimentbildung bezeichnet. Diese Kompartimente wurden außen von der heterochromatinreichen Matrix mit fibröser Lamina begrenzt, und die innere Kernmembran stellte die innere Barriere des erweiterten Raumes dar. An keiner Stelle konnte eine äußere Kernmembran nachgewiesen werden. Die sich ergebenden Räume hatten ein längliches, parallelwandiges, zylindrisches Erscheinungsbild oder auch eine rundliche Struktur. Durch perlenschnurartige Aneinanderreihung dieser Räume ergab sich eine Abtrennung von nukleoplasmatischer Matrix. Durch die in mehr oder minder regelmäßigen Abständen brückenähnlichen Verbindungen blieb das abgetrennte

Material in Verbindung und Kontakt mit dem übrigen Nukleoplasma. Die quasi separierten nukleoplasmatischen Anteile waren durchsetzt von weiteren Vakuolen und kleineren Kompartimenten mit dem dargestellten Aufbau und erschienen sehr inhomogen.

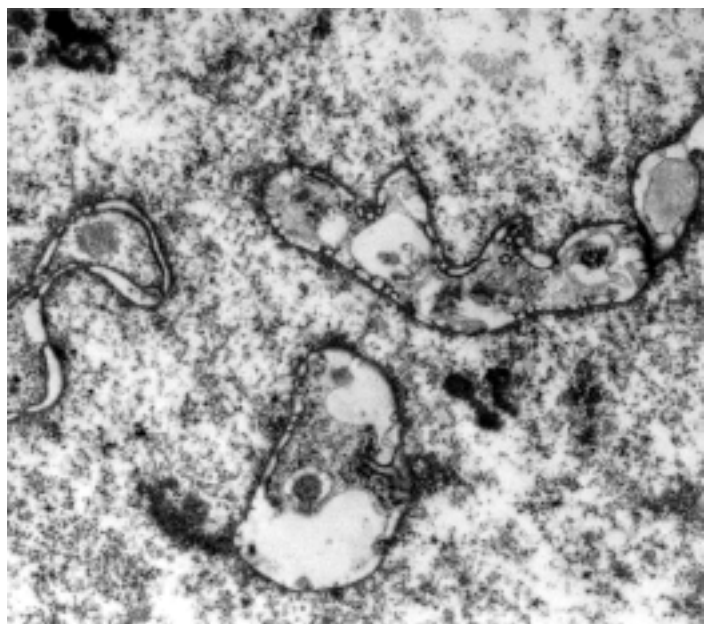
Einzelne Kompartimente wiesen nur teilweise Wandanteile im oben beschriebenen Aufbau auf, und kurze Strecken wurden nur durch feine membranöse Strukturen ohne fibröse Lamina und marginales Heterochromatin gebildet. Diese Räume waren dann deutlich größer und von unklarer Gestalt.

Die Kompartimente selbst waren nur von geringst kontrastgebendem Material gefüllt (s. Abb. 20a, 20b, 20c, 20d, 20e).

*Abb. 20a: DCM-Patient
Hohlraumbildendes System scheint zu konfluieren, Hohlräume mit einfacher Membran und solcher mit einfacher Membran und Lamina mit marginalem Chromatin umschlossen, jedoch ohne Doppelmembran, Hohlräume mit unterschiedlichen Materialien gefüllt. x 99000*



*Abb. 20b: DCM-Patient
Kompartimente intranukleär, durch kettenbildendes Hohlraumssystem erscheinen Matrixanteile abgetrennt, sind aber durch brückenartige Verbindungen noch in Kontakt, Hohlräume selbst mit nur geringst kontrastgebendem Material gefüllt bis auf einen Einschluß von filamentärem Material. x 46200*



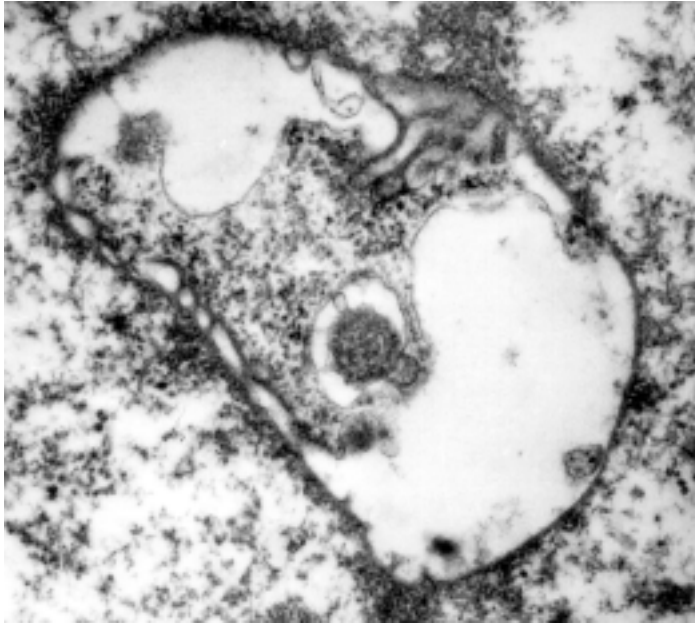


Abb. 20c: DCM-Patient
Innerhalb des Kompartimentsystems
Brückenbildung durch nukleäre
Matrix mit erneuter Hohlraum-
bildung, im inneren Bereich der
Hohlräume Formverlust durch Aus-
bildung einer einfachen Membran
ohne Laminaanheftung und ohne
marginale Chromatin. x 132000

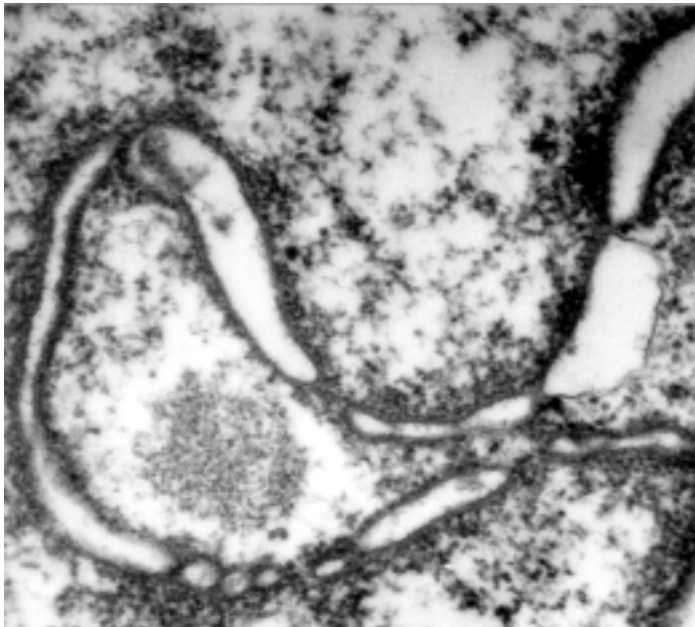


Abb. 20d: DCM-Patient
Innerhalb des Kompartimentsystems
kommt es in Bereichen des Fehlens
der Lamina zu Verbreiterung und
Aussackung der Hohlräume.
x 198000

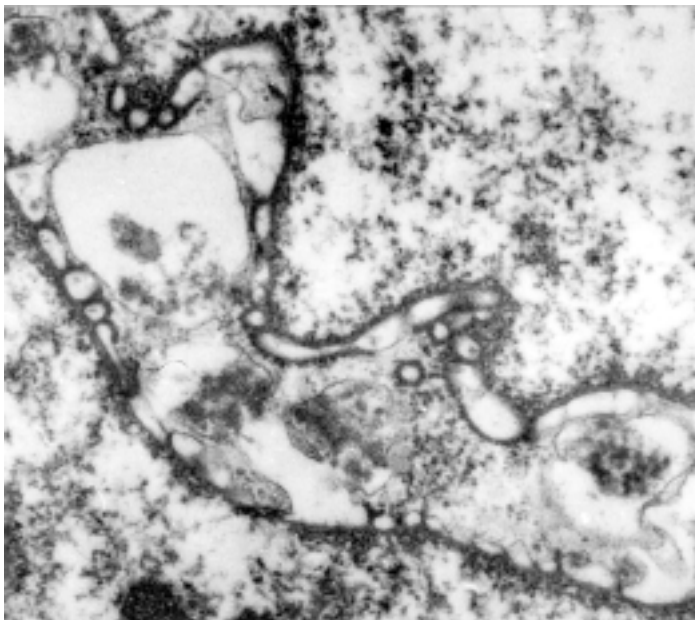


Abb. 20e: DCM-Patient
Kompartimentsystem mit Aus-
sackungen in Bereichen ohne
Lamina, mit erneuten Vakuolen
innerhalb der eingeschlossenen
nukleären Matrix. x 132000

3.1.6. Intranukleäre Einschlüsse

3.1.6.1. Kontrollgruppe

Die nukleäre Matrix der Kerne der Patienten mit normalem linken Ventrikel stellte sich frei von jeglichen Einschlüssen dar.

3.1.6.2. DCM-Patientengruppe

Kerne der DCM-Patienten wiesen unterschiedliche Einschlüsse in Form von intranukleären Zellorganellen oder Matrixansammlungen unterschiedlicher Zusammensetzung auf, die im folgenden näher dargestellt werden.

3.1.6.2.1. Intranukleäre Mitochondrien

Mitochondrien kamen frei im Nukleoplasma zu liegen. Es gab keinerlei Kernmembranbildung um diese Mitochondrien und auch keine Bildung eines chromatinfreien Hofes, es handelte sich hier um echt nukleäre und keine Pseudoeinschlüsse.

Die Lokalisation der eingeschlossenen Mitochondrien zeigte keine Regelmäßigkeit, sie wurden in direkter Nähe zum Nukleolus sowie auch in submembranösen Kernabschnitten aufgefunden .

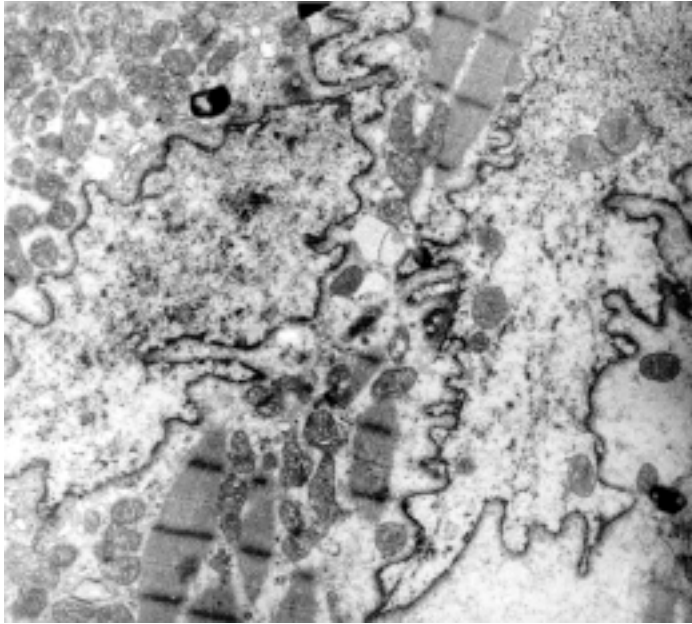
Die Anzahl der pro Kern eingeschlossenen Mitochondrien variierte.

Direkt im Areal dieser Mitochondrien kam es auch zum Einschluß von kleinen konzentrischen, stark kontrastgebenden Strukturen, die teilweise zentral aufgehellte erschienen.

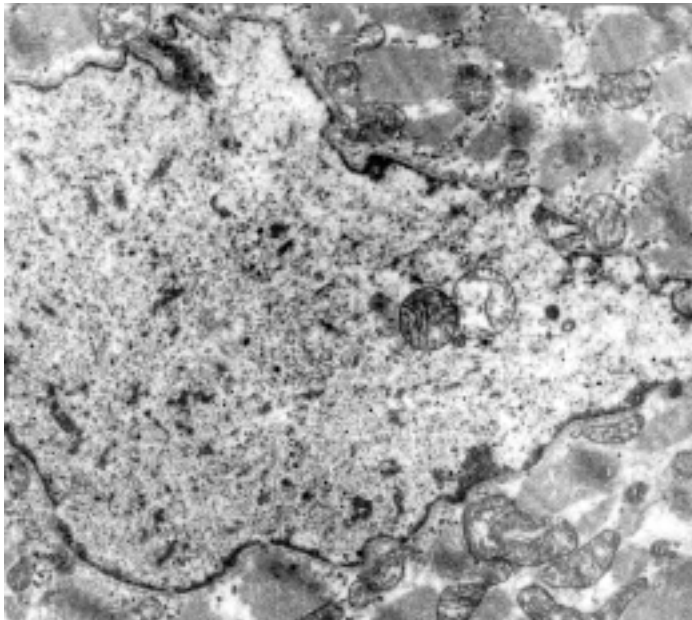
Die Mitochondrienstruktur war im gleichen Zustand wie die der zugehörigen sarkoplasmatischen Mitochondrien. Die Mitochondrienmembran war deutlich ausgebildet, die Cristastruktur nachzuvollziehen.

Nur vereinzelt wurden Mitochondrien intranukleär aufgefunden, deren Membran aufgelöst erschien und deren Matrix frei im Nukleoplasma lag (s. Abb. 21a, 21b, 21c, 21d).

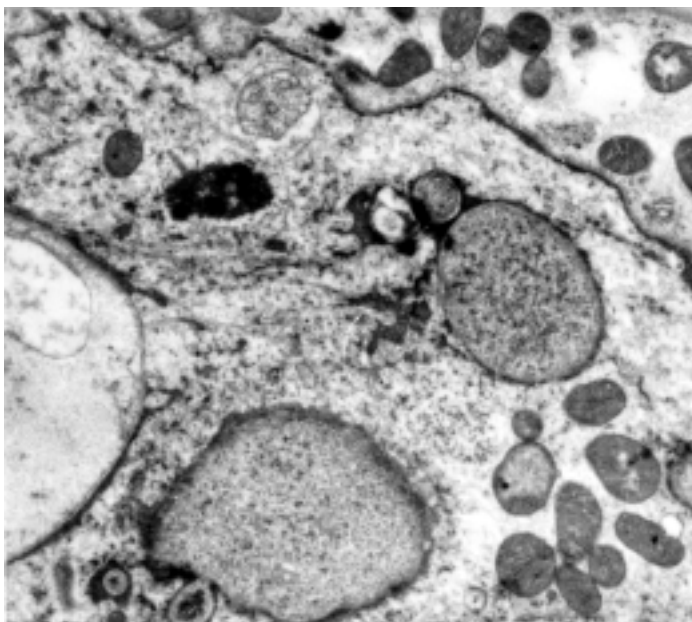
Die den Kern vom Sarkoplasma separierende Membran war entweder intakt oder wie an zwei Kernen mit mitochondrialem Einschluß unvollständig und unterbrochen, und es bestand Kontakt vom Nukleo- zum Sarkoplasma (s. Abb. 21d).



*Abb. 21a: DCM-Patient
Intranukleäre Mitochondrien bei
intakter Kernmembran. x 29700*

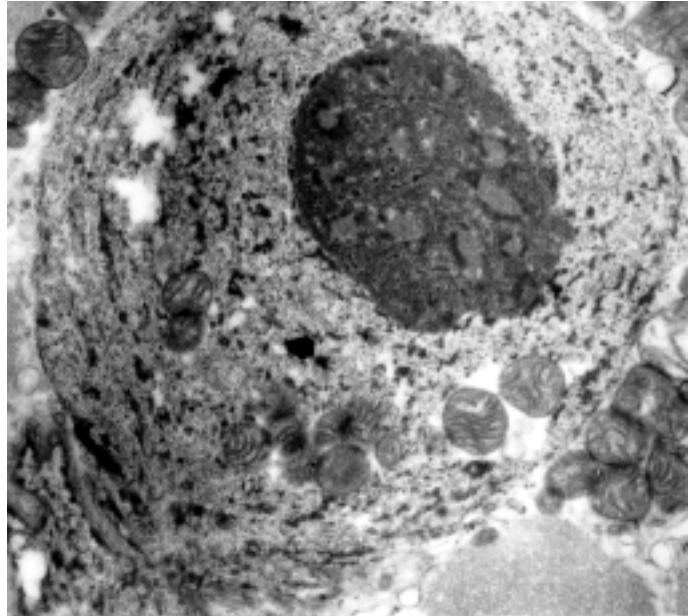


*Abb. 21b: DCM-Patient
Intranukleäre Mitochondrien und
kleine Vakuolen intranukleär bei
intakter Kernmembran, bemerkens-
wert: zahlreiche Perichromatin-
granula. x 46200*



*Abb. 21c: DCM-Patient
Intranukleäre Mitochondrien,
Pseudoeinschlüsse und Einschlüsse
mit unvollständiger membranöser
Separierung, Kernmembran intakt.
x 46200*

*Abb. 21d: DCM-Patient
Intranukleäre Mitochondrien bei
kometenartigem Kern mit fehlender
membranöser Separierung vom
Sarkoplasma, bemerkenswert: kom-
pakter großer Nukleolus mit zehn
filamentösen Centern. x 66000*



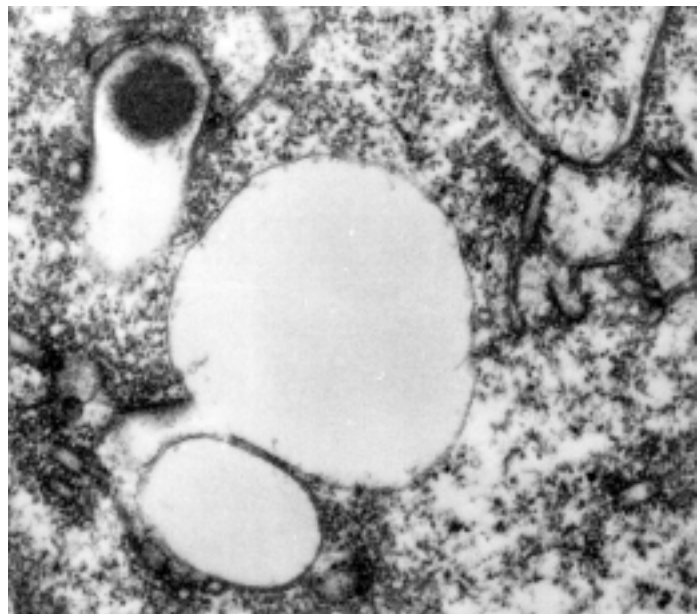
3.1.6.2.2. Intranukleäre Vakuolen

Es wurden in den Kernen der Myozyten der an DCM erkrankten Patienten Vakuolen unterschiedlichster Größe gefunden.

Zirkulär waren diese Hohlräume von einer feinen Membran umgeben. An der Membran kam es nicht zur Margination des Chromatins.

Innerhalb der Vakuolen fanden sich keine definierten Strukturen, sie erschienen teilweise komplett leer und hatten keine elektronendichte Matrix. Andere hingegen waren locker gefüllt mit gering kontrastgebenden, nur unscharf begrenzten zirkulären Strukturen aus fein granulärem Material.

*Abb. 22: DCM-Patient
Vakuolen innerhalb nukleärer
Matrix mit nur einfacher mem-
branöser Separierung vom Nukleo-
plasma, große Vakuole ohne Lamina
und marginales Heterochromatin,
kleinere Vakuolen zumindest stellen-
weise mit Lamina und rand-
ständigem Chromatin, stark kon-
trastgebende rundliche Struktur
wird in kleiner Vakuole einge-
schlossen, bemerkenswert: zahlreiche
intranukleäre Tubuli. x 132000*



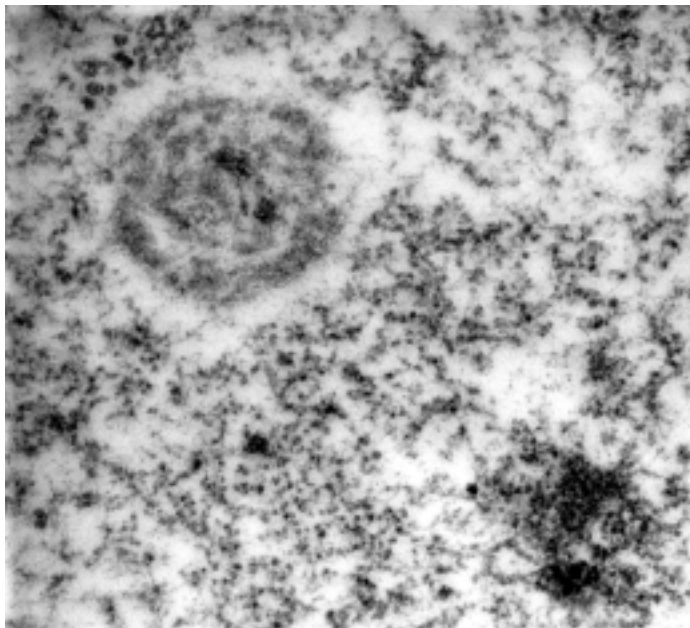
Wiederum in anderen kam stark kontrastreiches Material auch in konzentrischer Anordnung vor.

Die Lage der Vakuolen im Kern war rein zufällig (s. Abb. 22).

3.1.6.2.3. Nukleäre Einschlußkörperchen (bodies)

Es wurden Strukturen aufgefunden, die inmitten der nukleären Matrix umgeben von einem chromatinfreien Hof lagen. Die Struktur war feinfibrillär mit konzentrischer Anordnung der Komponenten. Die Größe der als nukleärer Body bezeichneten Struktur entsprach etwa der Hälfte der Fläche des Nukleolus des Kernes.

Ein weiterer nukleärer Body wurde dargestellt, in der Größe deutlich kleiner und mit wolkigem Erscheinungsbild, es bestand keine konzentrische Anordnung. Das hofbildende Areal zirkulär um diesen nukleären Body war frei von kontrastgebendem Material (s. Abb. 23).

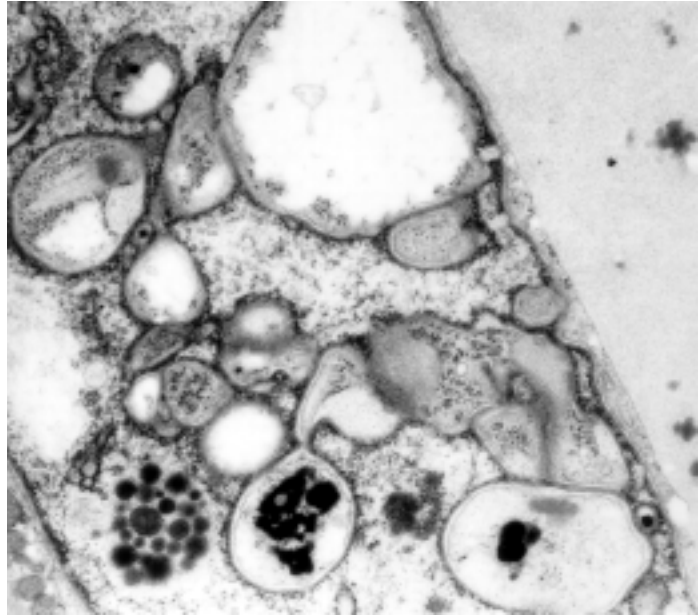


*Abb. 23: DCM-Patient
Nukleärer Body mit chromatin-
freiem Hof mit konzentrischer
Anordnung seiner Komponenten.
x 198000*

3.1.6.2.4. Einschlüsse unklarer Zusammensetzung

Im Nukleoplasma eines Kernes fanden sich in einer Ansammlung von bis zu 25 Elementen, umgeben von einem chromatinarmen, hellen Hof, sehr dunkle, runde, stark kontrastgebende Strukturen unterschiedlicher Größe, von denen nur einzelne membranös gefaßt zu sein schienen. Sie lagen ohne Umhüllung ihrer Ansammlung mit membranösen Strukturen frei im Nukleoplasma in direkter Nähe zu einer Vielzahl von Pseudoeinschlüssen und in intranukleärer Tubuli-reicher Zone. Es bestand keine Margination des Chromatins (s. Abb. 24).

*Abb. 24: DCM-Patient
Dunkle, stark kontrastgebende
Ansammlung von zirkulären
Strukturen mit und ohne Membran,
umgeben von chromatinfreiem Hof,
Strukturen unterschiedlicher Größe,
wahrscheinlich Lipid, bemerkens-
wert: konfluierende Pseudoein-
schlüsse, intranukleäre Tubuli,
eingeschlossenes Z-Band-Material,
perinukleär große Ansammlung fein
filamentären Materials. x 66000*



3.1.7. Besonderheiten im Nukleoplasma

3.1.7.1. Kontrollgruppe

Es waren keine Auffälligkeiten und Besonderheiten innerhalb des Nukleoplasmas zu verzeichnen.

3.1.7.2. DCM-Patientengruppe

Es ließen sich Besonderheiten innerhalb der nukleären Matrix auffinden, die aufgrund der Struktur, auf die hier näher eingegangen werden wird, keine eindeutige Klassifizierung in Einschlüsse, Pseudoeinschlüsse, nukleäre Bodies oder andere Erscheinungen erlauben.

3.1.7.2.1. Filamentäres Material

Neben konzentrischen Tubuli und Kernporen kam intranukleär ohne Hofbildung fein filamentäres, elektronendichtes Material sehr dicht gepackt von ovaler Form vor. Die Fläche des eingeschlossenen Materials entsprach etwa der durchschnittlichen Mitochondriengröße des Myozyten. Eine membranöse Separierung war nicht deutlich.

Es kam zum Einschluß dieses Materials mit gleichzeitiger Margination von Heterochromatin und Angrenzung eines U-förmigen Tubulus.

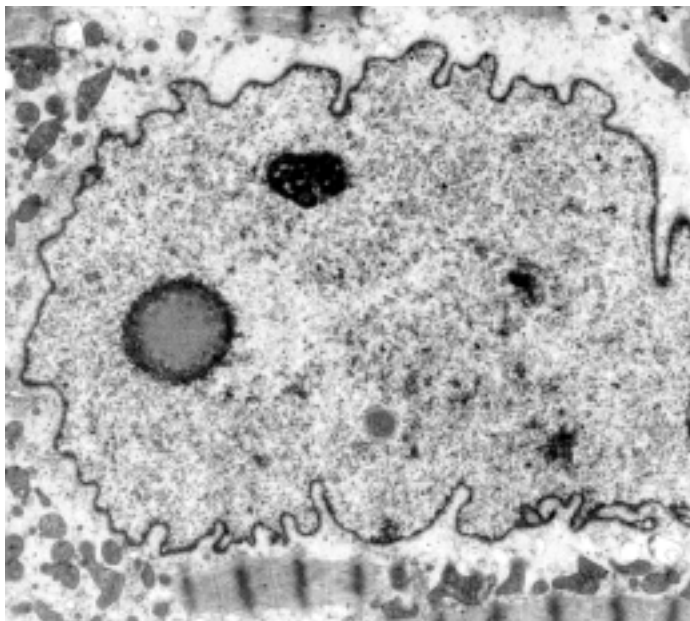
Im Sarkoplasma, angeschmiegt an einen kleinen Anschnitt des Kernes und in einem Pseudoeinschluß, lag identisches Material.

Dieses fein filamentäre Material wurde auch in anderen Kernen eingeschlossen und dicht verpackt im Nukleoplasma.

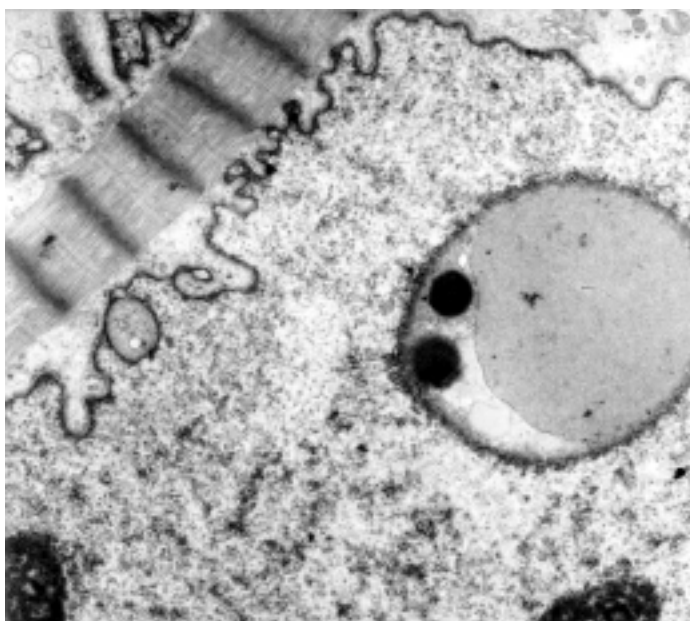
Die Menge und die damit belegte Kernfläche des eingeschlossenen Materials variierte stark.

Das Material war so dicht gepackt, daß es einen verschmolzenen Eindruck machte, in entsprechender Vergrößerung war allerdings die Zusammensetzung aus fein filamentären Strukturen zu verdeutlichen (s. Abb. 25 a, 25b, 25c, 25d, 25e).

Es resultierten auch sehr große Areale mit diesem Material, die zusätzlich innerhalb der Areale extrem kontrastgebende, wolkenartige Einschlüsse ohne membranöse Separierung aufwiesen (s. Abb. 25d).



*Abb. 25a: DCM-Patient
Zwei Einschlüsse mit feinst
filamentärem Material, einerseits
zirkulär mit Heterochromatinsaum
und andererseits deutlich kleineres
zirkuläres Areal mit kleinen
Ausbuchtungen des Materials ohne
Heterochromatinanlagerung.
x 29700*

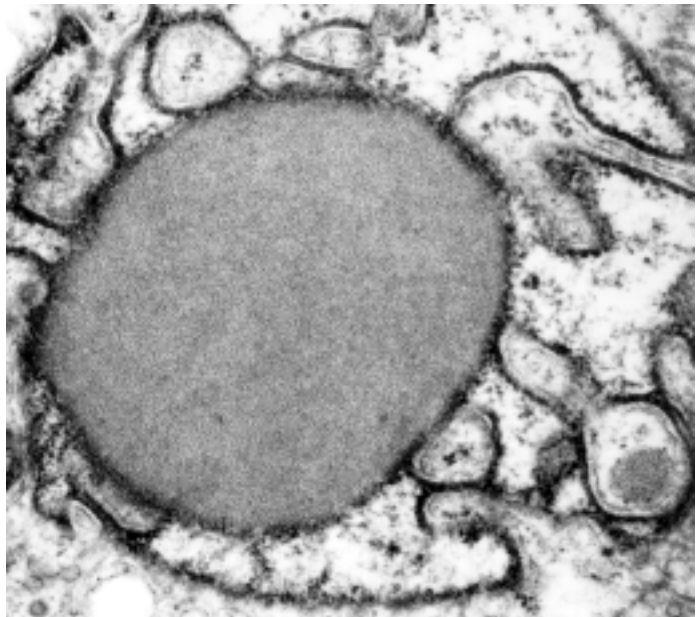


*Abb. 25b: DCM-Patient
Großer Einschuß von feinst
filamentärem Material ohne deut-
liche Membranabgrenzung aber mit
zirkulärer Heterochromatinan-
sammlung, innerhalb des Ein-
schlusses auch membranös abgesetzt
zwei stark kontrastgebende runde
Strukturen, wahrscheinlich Lipid.
x 46200*

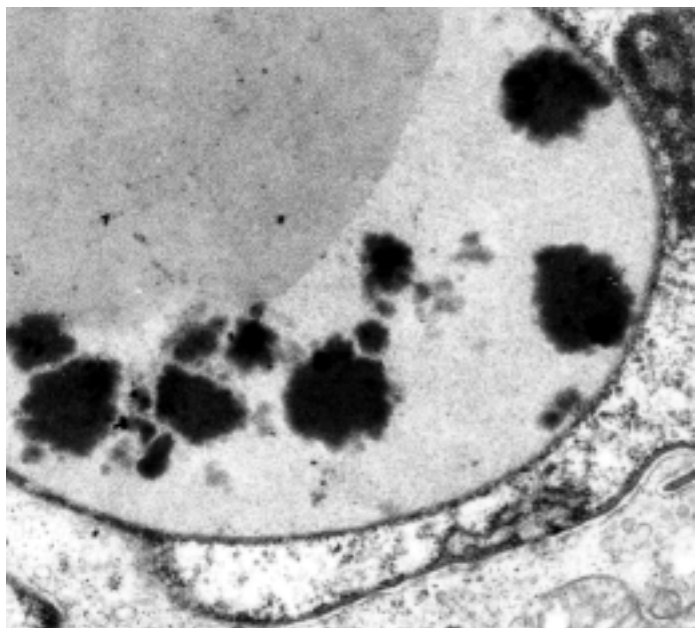
Um diese feinen Filamente kam es zur zirkulären Wandständigkeit des Chromatins, häufig auch zur Bildung eines regelrechten heterochromatinhaltigen Hofes um den Einschluß. Allerdings war in keinem Fall ein klassischer Kernmembranaufbau aufgefunden worden. Die Margination des Chromatins ließ aber an die Existenz zumindest einer inneren Kernmembran denken (s. Abb. 25a, 25b, 25c, 25d).

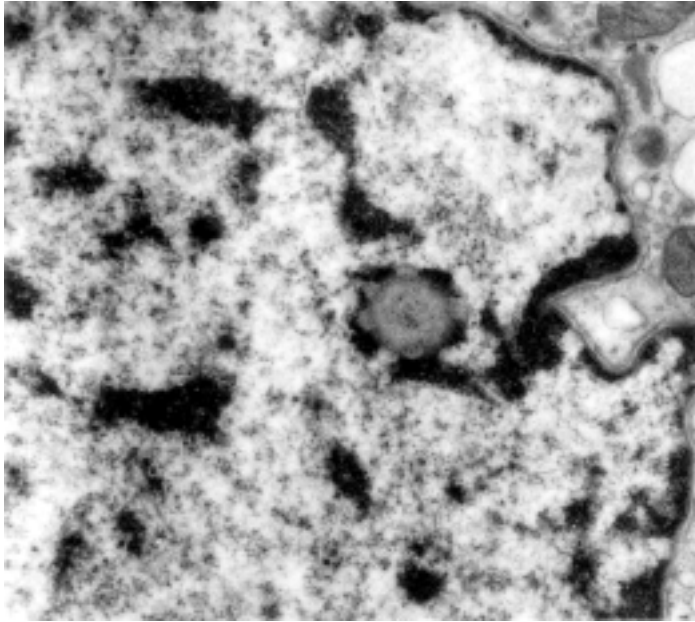
Eine Sonderform nahm ein einzelner Einschluß des identischen filamentären Materials ein, der eine rosettenartige Grundstruktur hatte, und das stark kontrastgebende Chromatin lag zwischen den „Ausläufern“ der Rosette (s. Abb. 25 e).

*Abb. 25c: DCM-Patient
Einschluß von feinst filamentärem
Material innerhalb Pseudoeinschluß-
reicher Zone, keine membranöse
Abgrenzung erkennbar, jedoch
marginaler Heterochromatinsaum.
x 198000*



*Abb. 25d: DCM-Patient
Großer Einschluß von feinst
filamentärem Material ohne erkenn-
bare Membran, mit geringem Hetero-
chromatinsaum, innerhalb des
eingeschlossenen Materials kommt
fleckartiges stark kontrastgebendes
Material mit unscharfer Begrenzung
vor. x 66000*





*Abb. 25e: DCM-Patient
Rosettenartiger Einschluß von feinst
filamentärem Material, zwischen
den Ausläufern kommt es zur
Ansammlung von Heterochromatin.
x 99000*

3.1.7.2.2. Kernpore

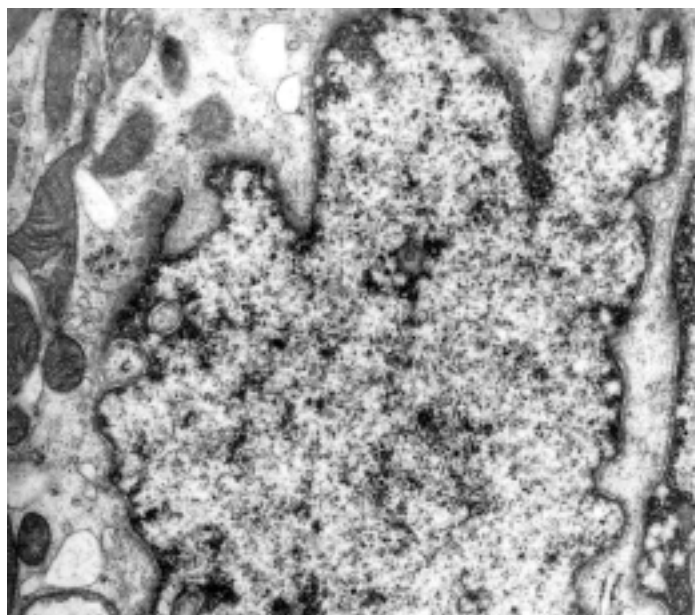
Als solitärer Befund wurde mitten im Nukleoplasma und in chromatinhaltiger Matrix eine konzentrische Struktur mit zentralem Knötchen aufgefunden.

Zirkulär lag kein Heterochromatin vor.

Es handelte sich hier um die Darstellung eines Kernporenkomplexes (s. Abb. 26).

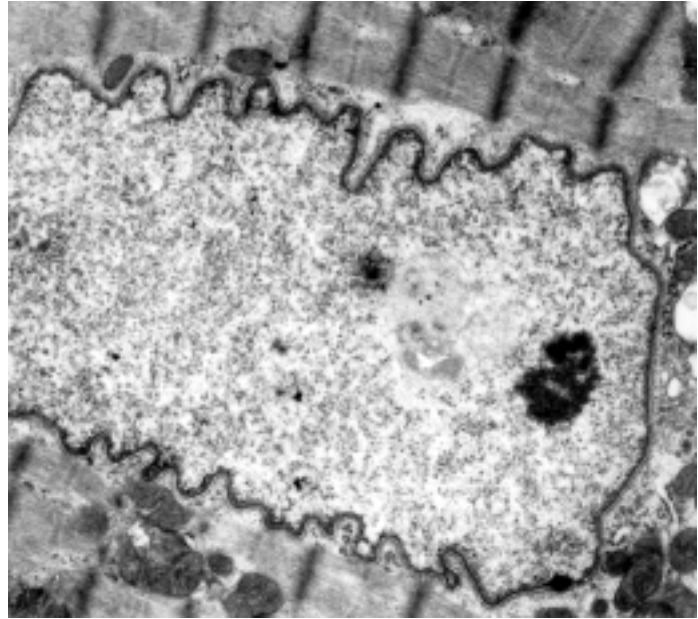
3.1.7.2.3. Nukleäre-Body-ähnliche Struktur

Innerhalb des Kernes in relativer Nähe zum Nukleolus, aber noch mit vorhandener Chromatinbarriere zu ihm, kam es zum Auftreten von Nukleären-Body-ähnlichen Erscheinungen.

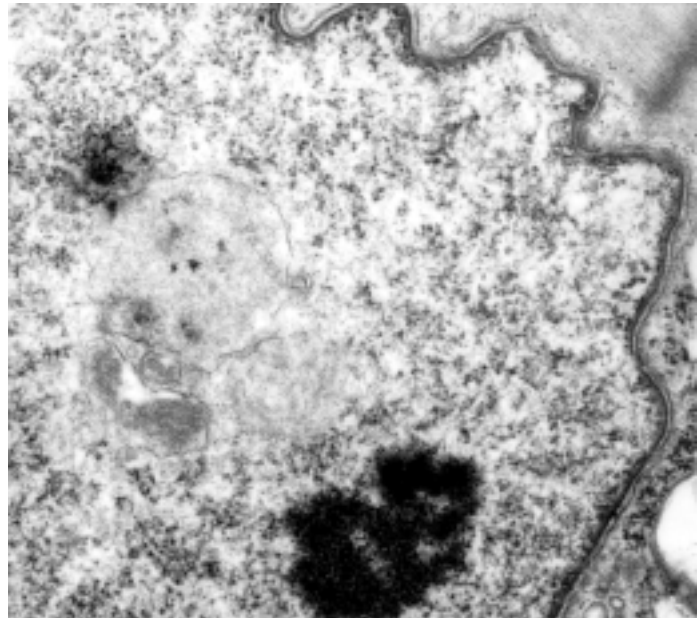


*Abb. 26: DCM-Patient
Inmitten nukleärer Matrix in
geringer Ansammlung von Hetero-
chromatin liegt kantig begrenzte
Struktur mit zentralem Knötchen,
wahrscheinlich Kernpore. x 66000*

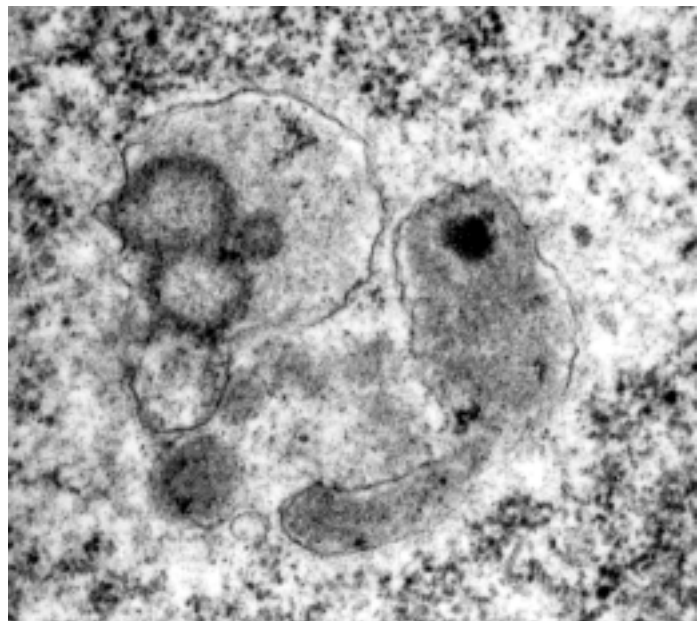
*Abb. 27a: DCM-Patient
Nukleäre-Body-ähnliche Struktur in
Nukleolusnähe. x 46200*



*Abb. 27b: DCM-Patient
Detailaufnahme von Abb. 27a, von
zartem, chromatinfreiem Hof um-
geben liegt diese Struktur aus
filamentären Materialien und
unterschiedlichen Komponenten
zusammengesetzt und abschnitts-
weise durchsetzt von einfacher
Membran. x 99000*



*Abb. 27c: DCM-Patient
Nukleäre-Body-ähnliche Struktur
umgeben von chromatinfreiem Hof,
konzentrische Strukturen mit und
ohne zentraler Aufhellung in feiner
granulärer Matrix, unregelmäßige
membranöse Abtrennung durch
einfache Membran. x 198000*



Diese Strukturen wurden von einem hellen, chromatinarmen Hof umringt. Die Struktur war aus mehreren unterschiedlichen Bestandteilen zusammengesetzt, die stellenweise von feinen, membranösen Strukturen durchsetzt wurden. Es kamen stark kontrastgebende, fibrilläre, längliche, zirkuläre und ringförmige Merkmale bildende neben feinfibrillär konzentrischen Komponenten vor.

Einzelne kleine Vesikel traten auf.

Das gesamte Konglomerat war nicht membranös separiert vom Nukleoplasma (s. Abb. 27a, 27b, 27c).

3.1.7.2.4. Einschlüsse/Pseudoeinschlüsse mit unterbrochener Kernmembran

Vereinzelt wurden Einschlüsse gesichtet, die eine unvollständige Membranbarriere zum Nukleoplasma aufwiesen.

Nur geringe Anteile des eingeschlossenen sarkoplasmatischen Materials waren separiert vom Kernmaterial, die übrigen Regionen des eingeschlossenen Materials hingegen traten in Kontakt mit Nukleoplasma und Chromatin. So lag neben einem Mitochondrium, welches einseitig membranös separiert war, an der anderen Seite Chromatin (s. Abb. 28a).

Innerhalb eines einzelnen Kernes trat dieses Phänomen bei mehreren Pseudoeinschlüssen zugleich auf.

Stellenweise war ein Membranverlauf nicht mehr zu eruieren, andererseits gab es Areale, da erschien jeweils nur die innere oder äußere Membran erhalten. Durch diese Besonderheit des Membranverlaufs kam es zum Kontakt zwischen Nukleo- und Sarkoplasma und zwischen den unterschiedlichen Einschlüssen, sie konfluieren regelrecht (s. Abb. 28b, 28c).

Eine Klassifizierung, ob es sich hier um Einschlüsse oder um Pseudoeinschlüsse handelte, war aus den dargelegten Gründen des unklaren Membranverlaufs nicht zu leisten.

Abb. 28a: DCM-Patient

Unterbrochene membranöse Separierung führt bei zwei Mitochondrien zu einseitiger Abgrenzung vom Nukleoplasma und an gegenüberliegender Seite zum Kontakt mit Chromatin, bemerkenswert: zahlreiche Perichromatingranula. $\times 46200$

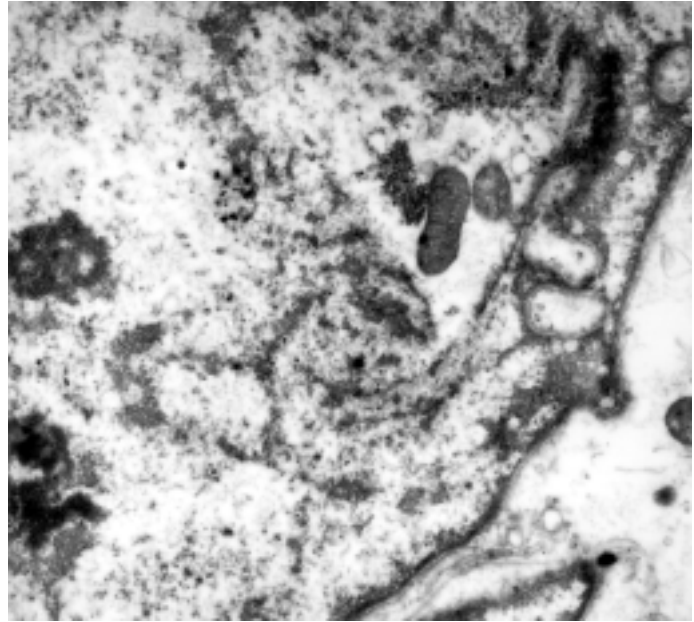


Abb. 28b: DCM-Patient

Aus unvollständiger membranöser Begrenzung der Pseudoeinschlüsse resultiert Konfluieren des eingeschlossenen Materials, die äußere Kernmembran als innere Begrenzung der Pseudoeinschlüsse ist unterbrochen. $\times 46200$

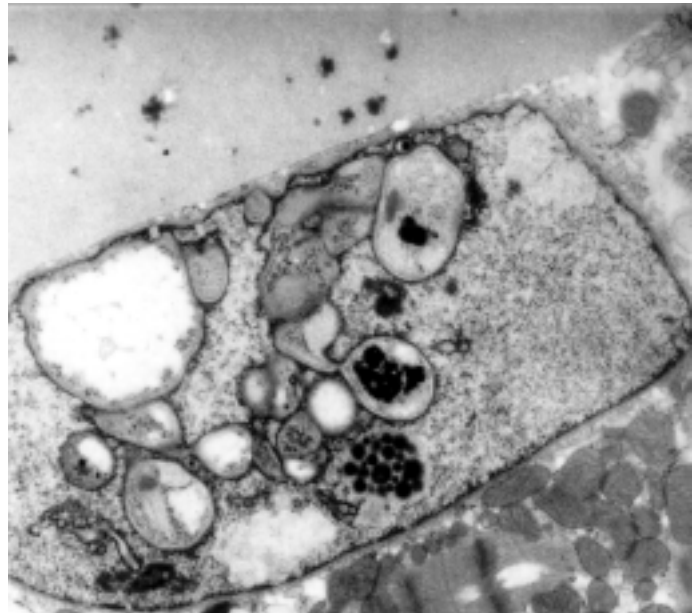
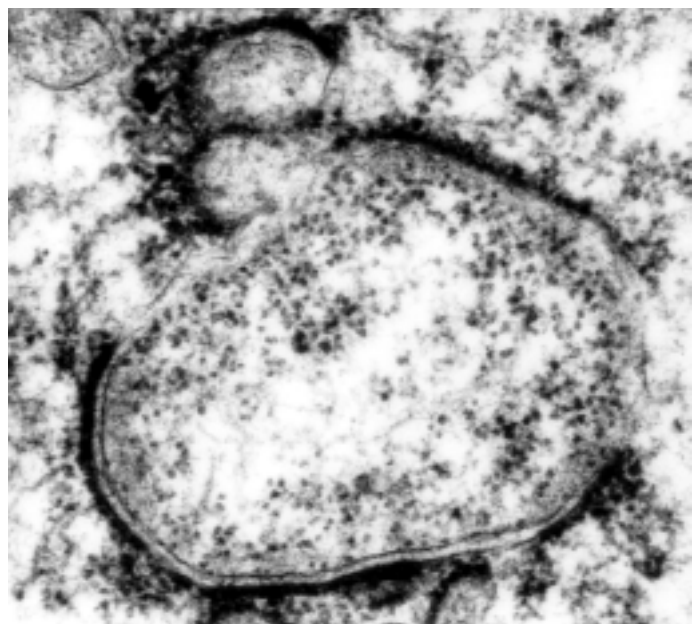


Abb. 28c: DCM-Patient

Einerseits Separierung durch Membran, andererseits unvollständige Anheftung und Fehlen der Lamina und damit auch des marginalen Heterochromatins, stellenweise vollständiger Verlust von separierenden Materialien zwischen eingeschlossenem Material und nukleärer Matrix. $\times 132000$



3.1.8. Nukleolus

3.1.8.1. Kontrollgruppe

Die Nukleoli der Kontrollgruppe stellten sich als runde oder ovale, stark kontrastgebende Struktur innerhalb des Kernes in mehr oder minder zentraler Position dar. Häufig gab es eine Anhäufung von nukleolusassoziiertem Chromatin.

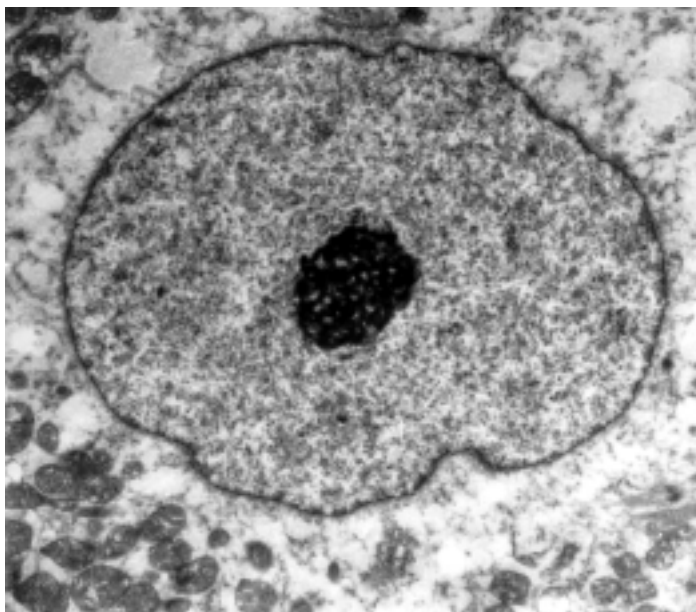
Der Nukleolus war aufgebaut aus dem rundlichen Pars amorpha und dem netzartigen, anastomosierenden Nukleolonema.

Das Nukleolonema war zusammengesetzt aus granulären und filamentären Komponenten, und die Proportion von diesen Komponenten variierte mit daraus resultierenden Kontrastunterschieden innerhalb des Nukleolonemas. Die dunkleren, dichteren und feiner strukturierten Areale enthielten dicht gepackte Filamente, die helleren hingegen waren granuläre Strukturen innerhalb einer filamentösen Matrix.

Das Nukleolonema umschloß netzartig einen oder mehrere runde Areale, den Pars amorpha oder filamentöse Center.

Da keine membranöse Abtrennung zum Nukleoplasma bestand, stellte sich innerhalb der vom Nukleolonema freigehaltenen Räume nukleäre Matrix dar.

Nur wenige Kerne enthielten mehr als einen Nukleolus, die maximale aufgefundene Anzahl betrug zwei Nukleoli (s. Abb. 29).



*Abb. 29: DCM-Patient
Nukleolus regelrecht aufgebaut mit
netzartigem Nukleolonema mittig
im Kern mit gleichmäßiger
Chromatinverteilung. x 29700*

3.1.8.2. DCM-Patientengruppe

Bei den Nukleoli der Patienten mit DCM stellten sich morphologische Veränderungen in Größe, Anzahl, Form und Lokalisation der Nukleoli innerhalb der Kerne dar.

3.1.8.2.1. Größe der Nukleoli

Größenunterschiede im Sinne einer Verkleinerung und auch einer Vergrößerung der von den Nukleoli beanspruchten Kernfläche im Vergleich zu den Nukleoli der Kontrollgruppe waren offensichtlich.

In denen wie schon dargestellt teilweise erheblich vergrößerten Kernen traten unerwartet kleine Nukleoli in Erscheinung. Stellenweise entsprach die Nukleoligröße in etwa der Größe eines Mitochondriums des Sarkoplasmas.

Sehr kleine Nukleoli fanden sich gehäuft in den Kernen mit sehr kontrastarmem, gleichmäßig über den Kern verteiltem Chromatin (s. Abb. 30a).

Im Gegensatz hierzu wurden Nukleoli aufgefunden, die in Orientierung zur myofibrillären Grundstruktur des Myozyten eine längsovale Form hatten und dabei eine Länge entsprechend von bis zu 6 Sarkomeren aufwiesen.

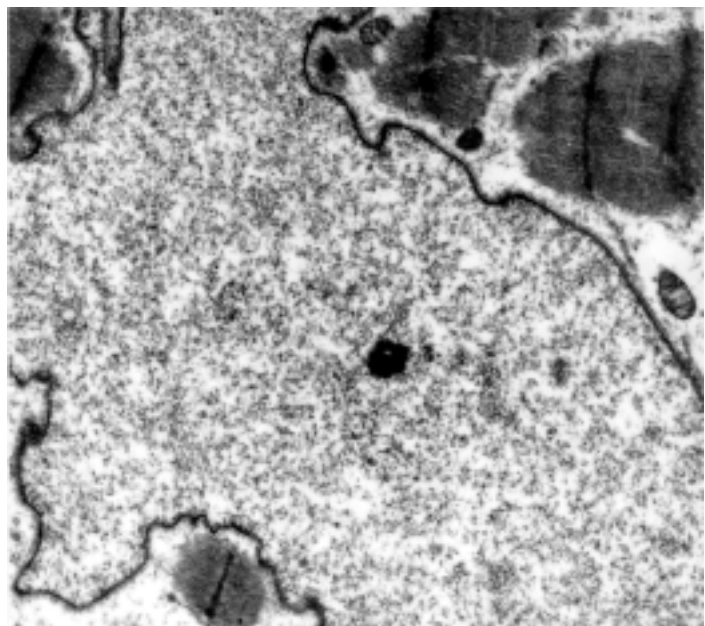
In vielen Zellen kam es zum Auftreten von Nukleoli in unterschiedlichen Größen gleichzeitig, wie einem sehr großen und bis zu sieben kleinen Nukleoli nebeneinander (s. Abb. 30b, 30c, 30d).

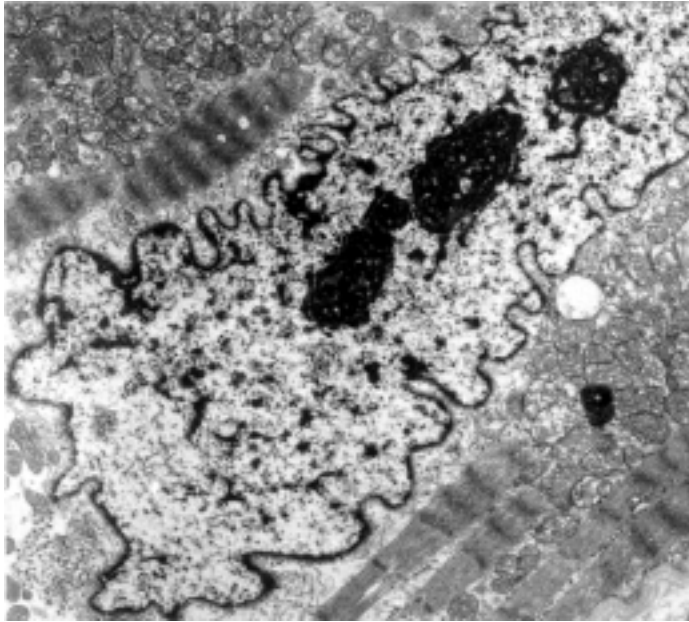
Auch erschienen bis zu drei gleichgroße Nukleoli in einem Kern gemeinsam.

Mitochondrien-große Nukleoli traten in dieser Patientengruppe als solitäre Nukleoli auf, nur einmalig wurde eine Anhäufung von kleinen Nukleoli aufgefunden.

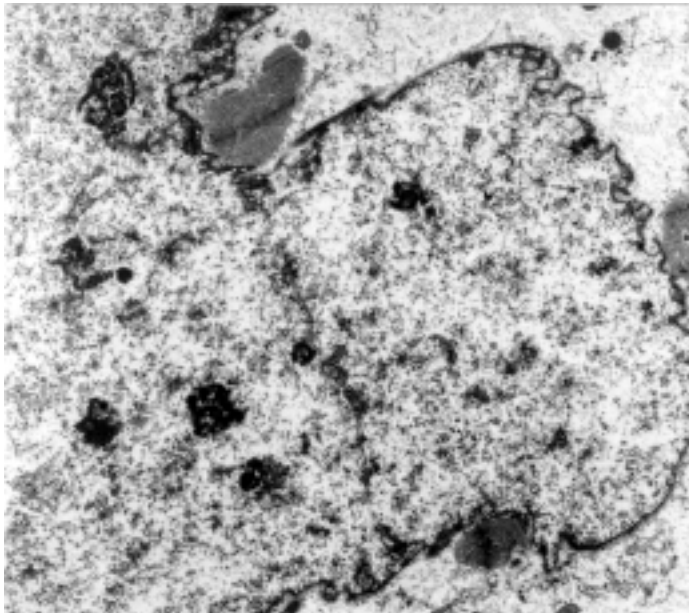
Abb. 30a: DCM-Patient

Großer, kontrastarmer Kern mit sehr kleinem Nukleolus, Größe des Nukleolus noch geringer als die der Mitochondrien des Myokards, keine Komponenten mehr zu unterscheiden. x 46200

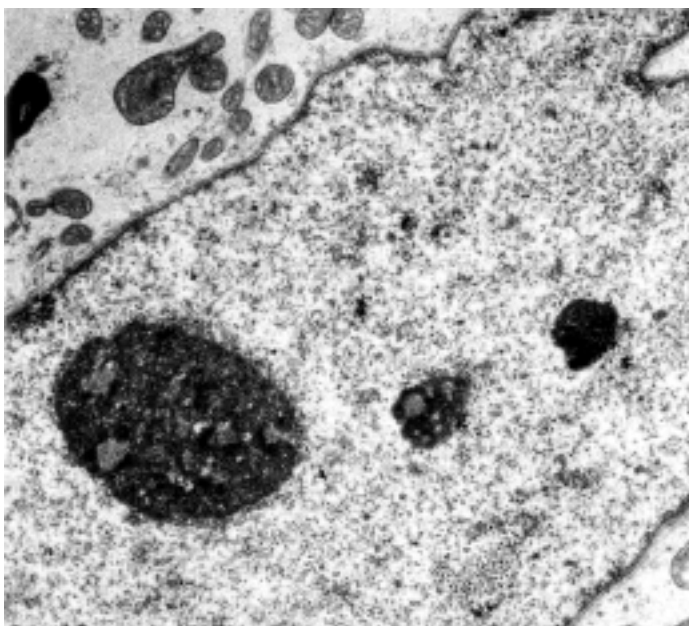




*Abb. 30b: DCM-Patient
Drei große Nukleoli aufgereiht in
großem Kern, Komponenten der
Nukleoli unterscheidbar. x 29700*



*Abb. 30c: DCM-Patient
Großer Kern mit sieben Nukleoli von
unterschiedlicher Form und Größe,
sehr kleine kompakte, ringförmige
und größere mit aufgelockerter
Struktur und Komponenten, neben-
einander über den Kern verteilt.
x 19800*



*Abb. 30d: DCM-Patient
Großer Nukleolus mit 3 filamen-
tösen Centern, neben kleinem mit
nur 1 filamentösen Center und einem
kleinen Nukleolus, der nur aus
Nukleolonema zu bestehen scheint.
x 46200*

3.1.8.2.2. Anzahl der Nukleoli

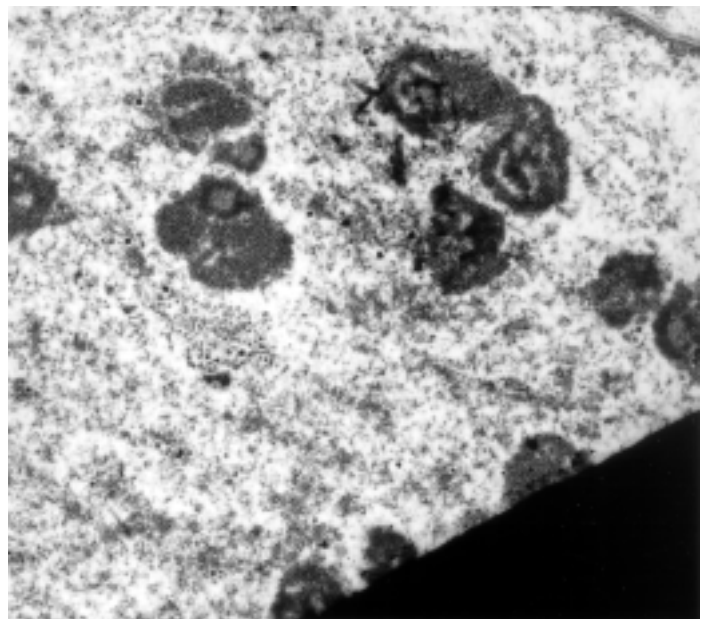
Einzeln auftretend im Nukleoplasma wurden sehr kleine, wie auch stark vergrößerte Nukleoli beobachtet.

In doppelt und dreifacher Anzahl vorkommende Nukleoli waren gehäuft festzustellen, wobei die oben besprochene Größenverteilung hier auch zum Tragen kam.

Kerne, die sechs bis acht Nukleoli aufwiesen, wurden mehrfach aufgefunden.

Die maximale Anzahl der in diesem Patientengut dokumentierten Nukleoli pro Kern betrug elf Nukleoli (s. Abb. 31).

*Abb. 31: DCM-Patient
11 Nukleoli nebeneinander auftretend in einem Kernanschnitt, bemerkenswert: viele Perichromatingranula. x 66000*



3.1.8.2.3. Form der Nukleoli

Es kamen runde, ovale neben eher kantig geformten Nukleoli vor (s. Abb. 32a).

Die Nukleoli hatten ein kontrastreiches, dunkles Nukleolonema und filamentöse Center. Sehr große Nukleoli wiesen mehrere filamentöse Center auf.

Es traten Nukleoli auf, bei denen aufgrund des anastomosierenden Nukleolonema ein gitternetzartiges Erscheinungsbild resultierte (s. Abb. 32b).

Auch existierten Nukleoli, deren nukleäre Matrix enthaltene Räume vergrößert erschienen und größere Anteile nukleärer Matrix durch stark geschwungenen Verlauf des Nukleolonemas eingeschlossen wurden.

Daneben existierten sehr kompakte Nukleoli mit rundem Erscheinungsbild und nicht deutlich zu unterscheidendem Nukleolonema.

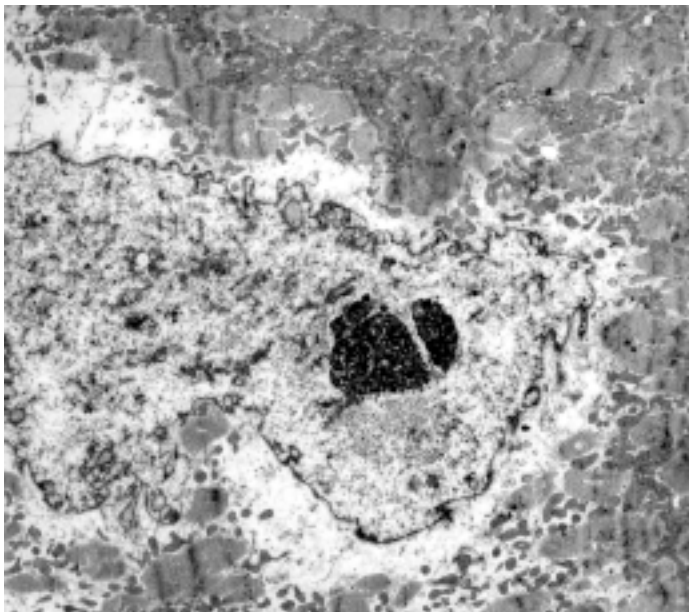
Eine Sonderform dieses runden Nukleolus wies ein einzelner Nukleolus mit massiv vergrößertem filamentösem Center auf, zirkulärer rosettenartiger filamentöser Zonenanordnung und umrundendem dunklen globulären Komponenten (s. Abb. 32c).

In den Kernen mit verklumpt erscheinendem Heterochromatin waren die Nukleoli auch sehr kompakt, und die unterschiedlichen Nukleolusstrukturen waren nicht klar voneinander zu separieren (s. Abb. 32d).

Weiterhin traten Gebilde aus Nukleoluskomponenten auf, die ringförmige Areale einschlossen und auch offenen Ringen gleich strukturiert erschienen. Sie traten solitär wie auch in direkter Nähe zu regulär aufgebauten Nukleoli auf. Das filamentöse Center schien zu fehlen (s. Abb. 32f, 32g).

Auch kam es zu längsgeschwungenen Nukleolusverläufen, die keiner kompakten Grundstruktur mehr zuzuordnen waren. Vereinzelt wurden große Räume durch das geschwungene Nukleolonema eingeschlossen, in denen nukleäre Matrix zu liegen kam. Die durch diese Strukturen belegte Kernfläche entsprach etwa der Länge der großen Nukleoli mit regulärer Grundstruktur.

Der Kontrast dieser Phänomene war aufgrund der großen eingeschlossenen Nukleoplasmaareale recht gering im Vergleich zu dem der sonstigen Nukleoli (s. Abb. 32e, 32f).



*Abb. 32a: DCM-Patient
Drei Nukleoli nebeneinander in
Ansammlung in halbmond, runder
und kantiger Form. x 13200*

Abb. 32b: DCM-Patient

Zwei gitternetzartig aufgebaute Nukleoli mit deutlicher Differenzierung von Nukleolonema mit filamentöser und granulärer Zone und von filamentösem Center, vom Nukleolonema wird intranukleoläres Chromatin eingeschlossen. $\times 29700$

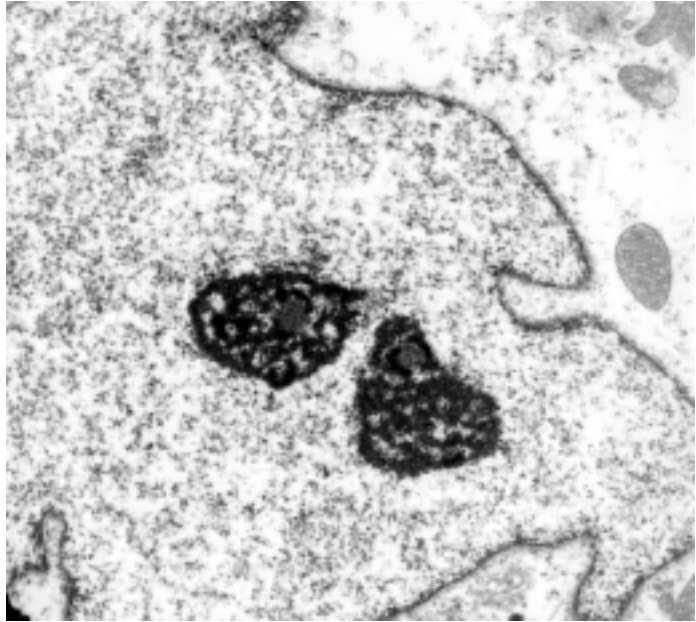


Abb. 32c: DCM-Patient

Länglicher und runder Nukleolus gleichzeitig in einem Kern, bei rundem Nukleolus auffällig ist die starke Vergrößerung des filamentösen Centers mit Umgrenzung von stärker kontrastgebender filamentöser Zone. $\times 46200$

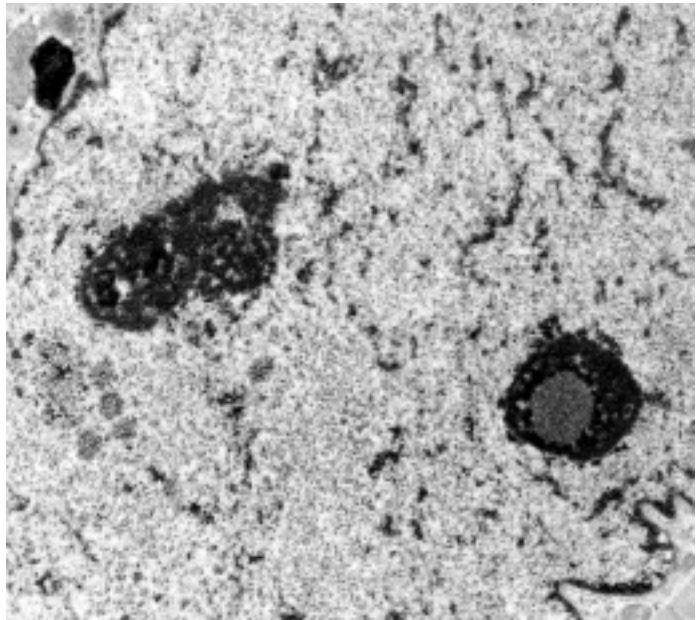
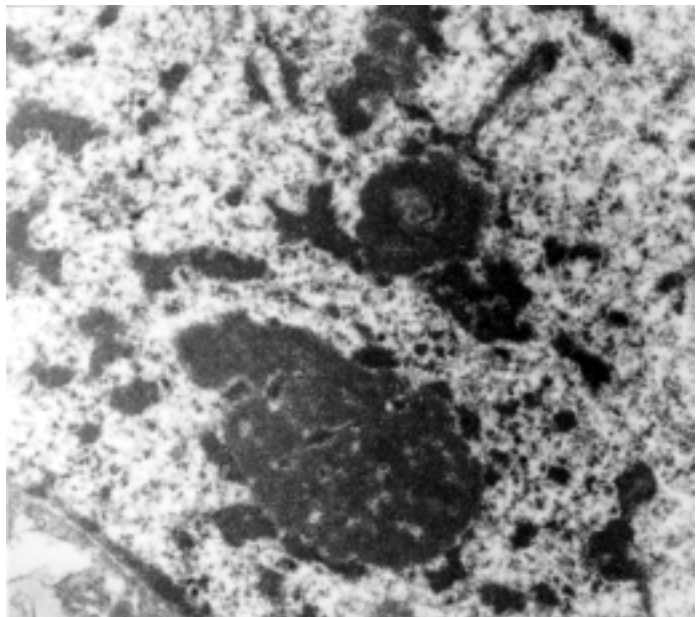


Abb. 32d: DCM-Patient

Kompakte Nukleoli im Kern mit vielen aggregierten, verklumpt erscheinenden Chromatinarealen, einzelne Komponenten der Nukleoli nur noch bedingt zu unterscheiden. $\times 99000$



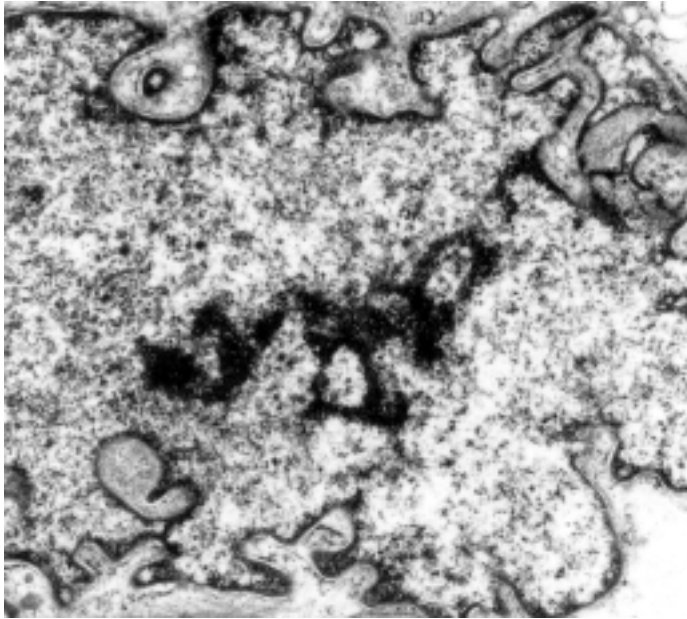


Abb. 32e: DCM-Patient
Langgezogener Nukleolus mit
geschwungenem Verlauf, kein
filamentöses Center zu erkennen.
x 66000

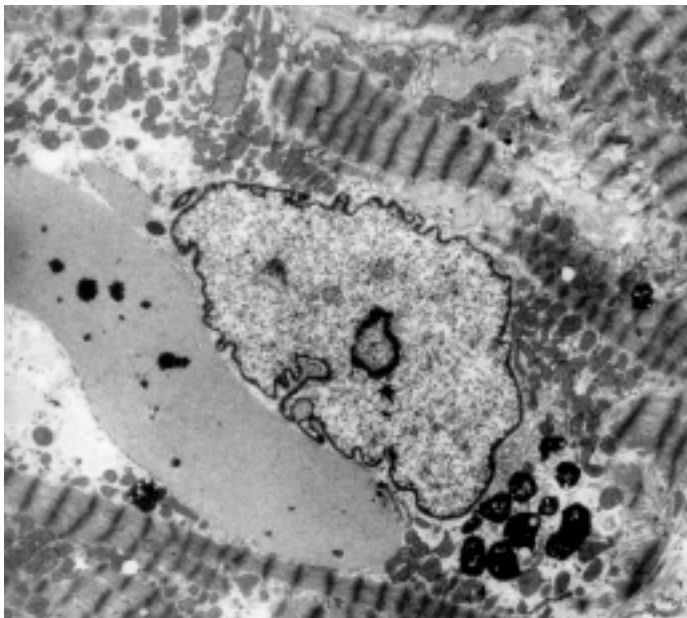


Abb. 32f: DCM-Patient
Ringförmiger Nukleolus mit großem
Einschluß von intranukleolärem
Chromatin, bemerkenswert: große
Ansammlung von feinst fila-
mentärem Material perinukleär.
x 19800

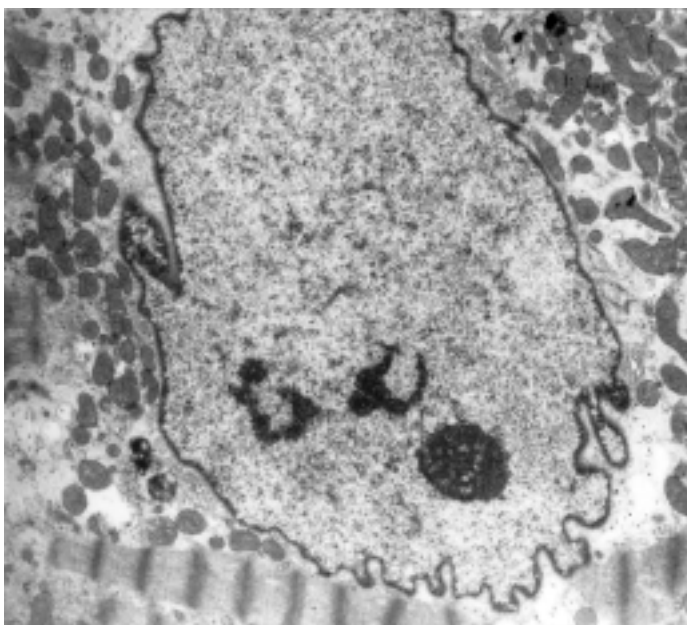


Abb. 32g: DCM-Patient
Drei Nukleoli nebeneinander etwa
die gleiche Kernfläche bean-
spruchend, aber von unter-
schiedlicher Form, regulärer Nukleo-
lus neben U-förmigen bzw. offenen
Ringern ähnlichen Nukleoli mit
großem Einschluß von intra-
nukleolärem Chromatin und
fehlendem filamentösem Center.
x 29700

3.1.8.2.4. Lage im Kern

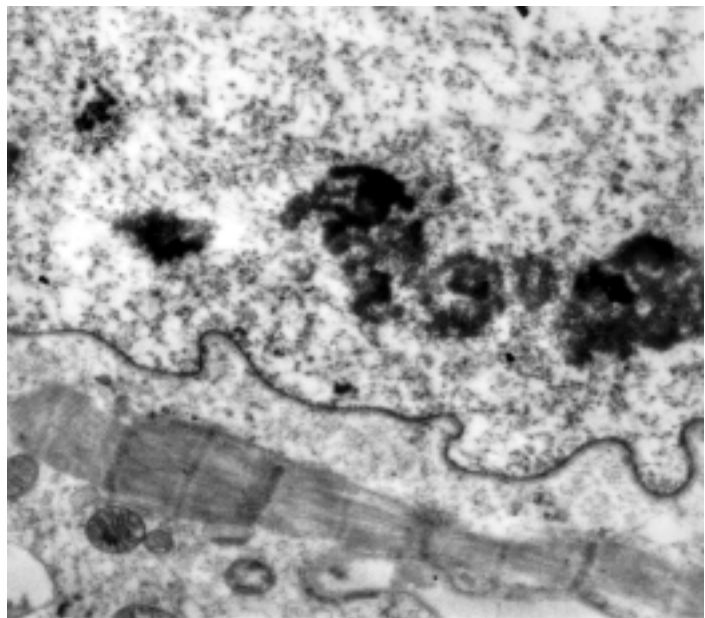
Die Mehrzahl der Nukleoli lag inmitten des Nukleoplasmas, aber nicht unbedingt in zentraler Position.

Die vergrößerten und dann in erhöhter Anzahl im Kern erscheinenden Nukleoli zeigten eine mittige Positionierung im Kern.

Sehr kleine Nukleoli wiesen keine Regelmäßigkeit der Lage auf, traten aber diffus im Nukleoplasma verteilt mit großen Abständen untereinander auf.

Einzelne Kerne wurden aufgefunden, deren Nukleoli direkt submembranös lagen. Alle Nukleoli der betroffenen Kerne waren aufgereiht in unmittelbarer Nähe zur Kernmembran zu sehen (s. Abb. 33).

*Abb. 33: DCM-Patient
Aufreihung von Nukleoli in peripherer Lage und unmittelbarer Nähe zur Kernmembran. x 66000*



3.2. ERGEBNISSE DER KONFOKALEN MIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG

3.2.1. Ergebnisse der Fluoreszenz-Feulgen Färbung

Die DNA-Konzentration pro Flächeneinheit der Patienten mit normalgroßem linken Ventrikel und regelrechter Funktion betrug 564,58 im Mittel.

Die durchschnittliche Kernfläche ergab bei den DCM-Patienten dagegen Werte zwischen 71,4 und 85,96, im Mittel 78,05, die Intensität der Fluoreszenz der Kerne konnte zwischen 58,79 und 124,32, im Mittel 86,50 gemessen werden. Die DNA-Konzentration pro Flächeneinheit der Kerne ($\text{AU}/\mu\text{m}^2$) errechnete sich auf Werte zwischen 206,89 und 495,98, im Mittel von 336,76.

Die DNA-Konzentration pro Flächeneinheit der DCM-Patienten war statistisch signifikant erniedrigt gegenüber der der Patienten der Kontrollgruppe ($p < 0,01$, durchgeführt wurde der T-Test für unverbundene Stichproben).

Aufgrund der Größenvariabilität der Kerne der Myozyten bei DCM wurde noch der absolute DNA-Gehalt ($\text{AU} \cdot \mu\text{m}^2$) errechnet und bei den Patienten mit normalem linken Ventrikel ergaben sich Werte zwischen 8053,40 und 9418,07, im Mittel 8721,21 und bei den DCM-Patienten Werte zwischen 4494,29 und 10457,03, im Mittel 6438,57. Der DNA-Gehalt der Kerne der DCM-Patienten war reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe, die statistische Auswertung ergab jedoch keine Signifikanz der Reduktion.

Tab. 2: Ergebnisse der Messungen des DNA-Gehaltes der Zellkerne durch Fluoreszenz-Feulgen-Färbung der Präparate

	Fläche	Durchschnittl. Fluoreszenz	Totale Fluoreszenz -intensität	Fluoreszenz / Fläche $\text{AU}/\mu\text{m}^2$	Fluoreszenz x Fläche $\text{AU} \cdot \mu\text{m}^2$
Kontrolle					
Patient 7	60,13	158,31	37801,64	635,31	9418,07
Patient 8	77,95	109,89	31327,04	425,20	8053,40
Patient 9	60,89	139,39	31533,39	538,02	8123,69
Patient 10	68,16	136,81	34146,18	536,59	8825,17
Patient 11	54,29	170,45	37192,72	687,78	9185,73
Mittelwert	64,29	142,97	34400,19	564,58	8721,21
St.abw.	9,09	23,11	3045,30	101,36	615,47
DCM					
Patient 1	77,86	93,12	25899,18	374,52	6601,12
Patient 2	77,91	61,57	17563,13	239,31	4494,29
Patient 3	85,96	124,32	41738,34	495,98	10457,03
Patient 4	71,4	58,79	13001,19	206,89	3648,82
Patient 5	74,76	109,14	31437,81	430,97	8000,19
Patient 6	80,38	72,08	20968,09	272,88	5430
Mittelwert	78,05	86,50	25101,29	336,76	6438,57
St.abw.	4,96	26,78	24968,31	114,97	2497,73

Abb. 34: Feulgen-Färbung zum Nachweis der DNA: Es ist deutlich, daß alle Kerne markiert sind, jedoch ist die Intensität der Fluoreszenz etwas unterschiedlich. Jeder Kern wurde einzeln umfahren und die Fluoreszenz gemessen.

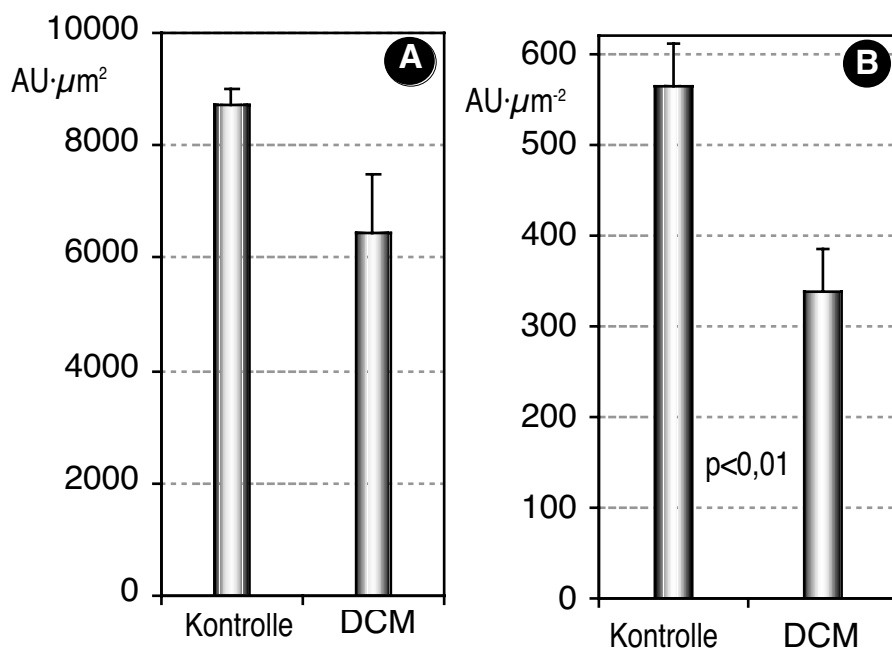
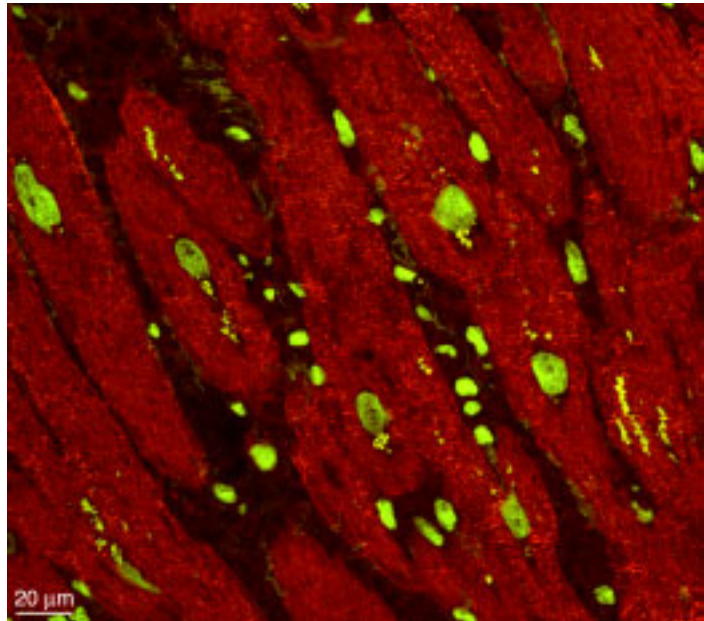


Abb. 35: Fluoreszenzintensität DNA (Feulgen)

A: Intensität x Kernfläche

B: Intensität / [μm^2] Kernfläche

3.2.2. Ergebnisse der Immunfluoreszenzreaktion mit monoklonalem Anti-Splicing Faktor SC 35

In der Kontrollgruppe ergaben sich für die gemessene Kernfläche Werte zwischen 43,04 und 70,38, im Mittel 56,71, die gemessene Kernfläche betrug zwischen 45,92 und 64,33, im Mittel 56,84 bei den DCM-Patienten.

In der Kontrollgruppe waren die Werte für die mittlere Fluoreszenz zwischen 128,47 und 213,83, im Mittel 171,15, in der DCM-Gruppe waren die Werte ähnlich zwischen 101,79 und 211,14, im Mittel 165,15.

Die totale Fluoreszenzintensität resultierte daher für die Kontrollen im Mittel bei 36561,35 und für die DCM-Patienten eine unerhebliche Abweichung dazu von einem Mittelwert von 36517,77.

Damit ergab sich eine Transkriptionsaktivität pro Flächeneinheit der Kerne ($\text{AU}/\mu\text{m}^2$) von 711,63 im Mittel bei den Patienten mit normalem linken Ventrikel und von 686,89 im Mittel für die DCM-Patienten.

Umgerechnet auf die gesamte Kernfläche resultierte ein absoluter Wert für die Transkriptionsaktivität ($\text{AU} \cdot \mu\text{m}^2$) von 8853,95 für die Kontrollpatienten und ein absoluter Wert von 8797,46 im Mittel für die DCM-Gruppe.

Damit wurde deutlich, daß die Kerne der Myozyten bei DCM zwar transkriptionsaktiv waren, aber ohne eine erhöhte Aktivität der Transkription gegenüber der Kontrollgruppe aufzuweisen.

Tab. 3: Ergebnisse der Messungen der Transkriptionsaktivität der Zellkerne durch Inkubation mit Anti-Splicing Faktor SC 35

	Fläche	Durchschnittl. Fluoreszenz	Totale Fluoreszenzintensität	Fluoreszenz/ Fläche $\text{AU}/\mu\text{m}^2$	Fluoreszenz x Fläche $\text{AU} \cdot \mu\text{m}^2$
Kontrolle					
Patient 7	43,04	213,83	38385,74	895,77	9158,56
Patient 8	70,38	128,47	34736,96	527,48	8549,34
Mittelwert	56,71	171,15	36561,35	711,63	8853,95
St.abw.	19,33	60,36	2580,07	260,42	430,78
DCM					
Patient 1	62,79	190,29	47382,81	793,17	11412,68
Patient 2	49,38	150,27	28588,48	627,08	6873,73
Patient 3	62,02	177,73	42007,35	738,81	10106,80
Patient 4	64,33	101,79	25139,72	419,26	6132,09
Patient 5	56,60	159,7	35341,94	663,42	8522,29
Patient 6	45,92	211,14	40646,33	879,56	9737,17
Mittelwert	56,84	165,15	36517,77	686,89	8797,46
St.abw.	7,66	37,87	8472,85	159,29	2015,81

Abb. 36: Inkubation mit Anti-Splicing-Faktor SC 35 zum Nachweis der Transkriptionsaktivität: Lokalisation des Anti-Splicing-Faktors SC 35 in den Kernen der Myozyten. Diese wurden individuell gemessen, wie in 2.3.3. beschrieben.

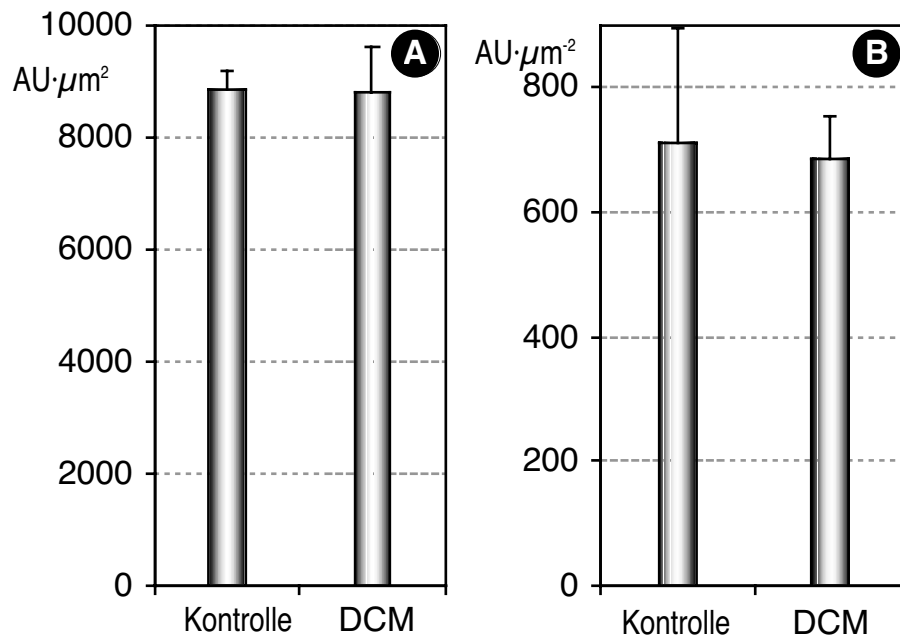
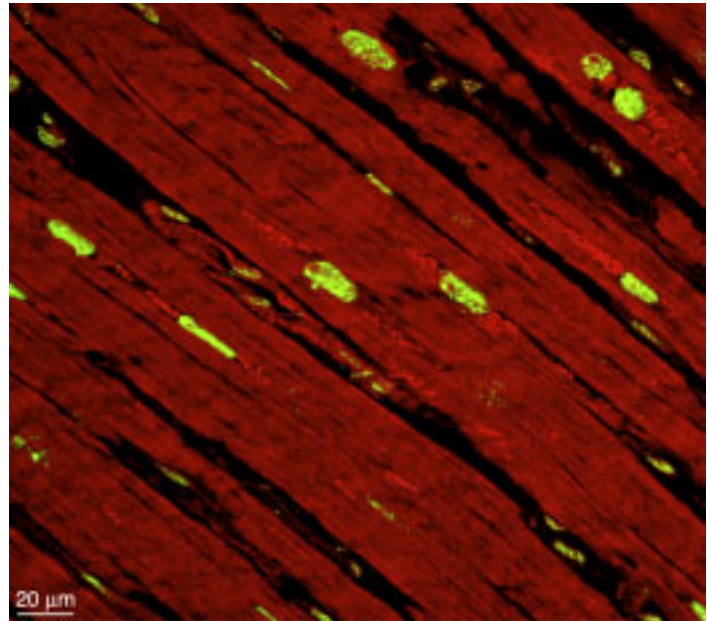


Abb. 37: Fluoreszenzintensität SC 35
A: Intensität \times Kernfläche

B: Intensität / [μm^2] Kernfläche

4. Diskussion

Kardiomyopathien sind nach WHO-Klassifikation Herzmuskelerkrankungen mit unbekannter Ursache, eine dilatative, hypertrophe und restriktive Kardiomyopathieform wird unterschieden (76).

Die dilatative Form der Kardiomyopathien ist eine Erkrankung des Herzmuskels, die bei Ausschluß einer Koronarerkrankung, kongenitalen Vitien des Herzens und Ausschluß einer Hypertonie diagnostiziert wird. Es kommt zur Dilatation der Ventrikel, mit Häufung der linken Kammer, Zunahme der Myokardmasse durch Hypertrophie und Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes und resultierender Beeinträchtigung der systolischen Funktion. Die DCM stellt die häufigste Form der Kardiomyopathien dar (45, 49).

Es wird eine DCM ohne Kongestion mit physiologischen oder geringgradig erhöhten Füllungsdrücken in Ruhe und unter Belastung normalen bis pathologischen Füllungsdrücken der Ventrikel von einer DCM mit Kongestion unterschieden. Diese Form beinhaltet schon in Ruhe oder nur geringer Belastung eine Erniedrigung des Herzminutenvolumens, und die Füllungsdrucke sind erhöht (45, 49).

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei asymptomatischer DCM liegt bei 80%, bei wiederholter Dekompensation verschlechtert sich die Prognose rapide.

Eine kausale Therapie existiert nicht, es wird symptomatisch therapiert auf Beseitigung der Insuffizienzzeichen. Neben der medikamentösen Therapie bestehen als Optionen Assist-Devices oder die Herztransplantation.

Infektiöse und toxische Agentien, immunologische und neuromuskuläre Defekte, Stoffwechselerkrankungen und genetische Disposition kommen als ätiologische Faktoren zur Pathogenese in Betracht.

4.1. PATHOHISTOLOGIE BEI DCM

Morphologisch liegt eine Reduktion des Myofibrillengehaltes bei gleichzeitiger Zunahme der interstitiellen Fibrose vor (89).

Die aufgefundenen intrazellulären Befunde zeigen eine große Heterogenität, vergrößerte Myozyten kommen neben solchen von normaler und geringerer atrophischen Größe vor (85). Es überwiegt der Anteil der deutlich vergrößerten Myozyten (30).

Hypertrophierte aber auch atrophische Zellen liegen in Arealen mit interstitieller Fibrose und erscheinen isoliert vom restlichen Myokard, der Zellverbund ist durch die Vermehrung der extrazellulären Matrix aufgelöst (85).

Die folgenden subzellulären Veränderungen wurden in der Literatur beschrieben: Die Reduktion der Myofilamente bis zum völligen Fehlen der Sarkomere und Auffüllung durch unspezifisches Zytoplasma ist der auffälligste elektronenmikroskopische Befund (84).

Mitochondrien kommen in größerer Anzahl, aber mit deutlich geringerer Größe vor. Eine Dilatation des T-Systems und des sarkoplasmatischen Retikulums wird aufgefunden als Zeichen der erhöhten Syntheseaktivität der Zelle. Golgikomplexe zeigen Größen- und Volumenzunahme, und Lipofuscin- und Lipidaggregationen treten im perinukleären Areal in Erscheinung. Myelinfiguren treten auf (56, 64, 65).

Nukleäre Veränderungen im Sinne von bizarr geformten und vergrößerten Kernen werden von vielen Autoren beschrieben (47, 56, 64, 65, 80).

Phänotypische Veränderungen des Nukleus werden zumindest teilweise auf Alterationen der nukleären Matrix zurückgeführt (19).

Während lange Zeit keine Korrelation der morphologisch erhobenen Befunde mit den klinischen Daten des Patienten festgestellt werden konnte (12, 14, 27, 106), und auch die Erkrankungsdauer keinen relevanten Zusammenhang zur Pathohistologie zeigte (99), wurden verschiedene morphologische Parameter zur Korrelation mit der Prognose verantwortlich gemacht, Mitochondrienzustand (100), Grad des Myofibrillenverlustes (39, 48) und Fibrosegrad (30). Aufgrund des inhomogenen Erscheinungsbildes der beschriebenen Alterationen innerhalb des Myokards bei DCM können aber nur wenig spezifische Befunde aus Katheterbiopsien erhoben werden.

Ungeklärt ist die Tatsache, warum einige Patienten mit morphologisch stark verändertem Myokard nur geringe Herzinsuffizienzzeichen aufweisen (14), und andere wiederum bei ähnlichem Myokardbefund aufgrund eines fortgeschrittenen Insuffizienzstadiums IV der NYHA transplantationspflichtig werden.

Durch die Fortschritte der Transplantationsmedizin ergibt sich heute der große Vorteil gegenüber Katheterbiopsien, auch große Gewebeproben in klar definierten Insuffizienzstadien untersuchen zu können (84).

Kernveränderungen werden von Diener als mögliche Ursache der DCM im Sinne einer gestörten Kernfunktion angenommen (30).

Bis heute erfolgte keine systematische Darstellung der morphologischen Veränderungen des Zellkernes bei DCM, die möglicherweise diese Hypothese untermauern könnte.

Da der Zellkern Träger der genetischen Information ist und Transkription und Translation möglich macht und reguliert, wäre eine gestörte Funktion des Kernes folgeschwer für den Myozyten.

Die hier dargelegten Veränderungen der Kerne bei DCM sind unterschiedlichster Natur und beziehen alle Kernstrukturen ein. Um diese beurteilen zu können und möglicherweise den ihnen zugrundeliegenden Pathomechanismus verstehen zu können, werden zunächst die physiologischen Strukturen und Parameter des Kerns angesprochen.

4.2. MORPHOLOGIE DES ZELLKERNES

4.2.1. Elektronenmikroskopischer Befund

Der Kern des Myozyten hat eine rechteckige Form mit glatter Oberfläche und liegt meist tief im Inneren des Myozyten (Länge bezogen auf die Myofibrillenordnung bis zu 10 Sarkomeren, entspricht etwa $20\text{ }\mu\text{m}$). Selten wird er in Sarkolemmnähe aufgefunden. Bei Kontraktion der Myofibrillen kommt es zur Faltung der Kernoberfläche. Die Myofibrillen liegen um den Kern herum unter Freihaltung einer konischen Zone, die von Zellorganellen (Golgi Komplex, Mitochondrien, Glykogen, Sarkoplasmatisches Retikulum, Lysosomen, Lipofuscingranula) dicht ausgefüllt wird (33, 38, 77).

Die strukturellen Komponenten des Kernes sind Kernmembran, Kernporen, nukleäre Matrix mit Chromatin und dem Nukleolus.

Die Kernmembran setzt sich aus der äußeren und der inneren Kernmembran mit trilaminarem Aufbau zusammen, die die perinukleäre Zisterne zwischen sich durch parallelwandigen Verlauf einschließen. Die Kernmembran ist in etliche intranukleäre Organisationsprozesse involviert (28). Ribosomen besetzen die äußere sarkoplasmatische Oberfläche der Kernmembran, und häufig wird ein direkter Übergang der äußeren Kernmembran in das membranbildende System des sarkoplasmatischen Retikulums beobachtet. Der inneren Oberfläche schmiegt sich eine proteinreiche Schicht (Schichtdicke 30-100 nm) aus Filamenten – als nukleäre Lamina bezeichnet – an (26). Die Lamina kann biochemisch isoliert werden, und die verbleibende Matrix hat die gleiche Form und Größe wie der behandelte Kern und setzt sich einzig aus den Laminproteinen zusammen, die ein stabiles Polymer-Netzwerk formen (69). Lamin A, B1, B2 und C sind die die Lamina bildenden Laminproteine, sie sind in Sequenz und Struktur den intermediären Filament-Proteinen sehr ähnlich. Die Verbindung von der Lamina mit der Kernmembran kommt nach Newport et al durch Lamin B zustande, da es eine spezielle Aufgabe der Bindung an die Membran hat, während die anderen Lamine an Lamin B binden und Interaktionen zwischen Chromatin und der Lamina vermitteln (26). Andere Autoren halten eine indirekte Interaktion zwischen Non-Lamin-Komponenten der

Nukleusmembran und einem Lamin B Rezeptor für möglich (28). Eine direkte Verbindung zwischen Liganden an der Oberfläche des Chromatins und einem membrangebundenen Rezeptor an der Kernmembran wird von Dessev angenommen (28). Die Lamina, Lamin-assoziierte Polypeptide und Lamin B Rezeptor binden an die DNA oder interagieren mit Chromatin über die Histone und beeinflussen dadurch die Chromosomenposition im Kern (44, 52, 75).

Die Lamina wird von Newport et al für den Erhalt der nukleären Form und als Grundgerüst für die Chromatinanheftung verantwortlich gemacht (69). Die nukleäre Lamina ist verantwortlich für die Integrität der Kernstruktur und dadurch für die DNA-Funktion, für die strukturelle Organisation des Chromatins, Chromatinkondensation und Nukleolusformation (28, 43). Die mechanische Kontinuität zwischen Zytoskelett und Kerninhalt wird durch die Lamina sichergestellt (20).

Durch Verschmelzungen der inneren mit der äußeren Kernmembran entstehen in Abständen die Kernporen, die für den nukleosarkoplasmatischen Substrataustausch ausschlaggebend sind. Jede Pore ist begrenzt von einem Annulus, der das zentrale Lumen begrenzt, und einige Kernporen enthalten ein zentrales Knötchen (Lumendurchmesser 55-70 nm, (42)). Die Wände sind aus randständigen, kolumnenartigen Strukturen, dem Annulus und aus den transmembranösen Glykoproteinen, die für die Verankerung der Porenkomplexe verantwortlich sind, aufgebaut (31). Annuli werden als äußere und innere Membranstrukturen aufgefunden und begrenzen als äußerer und innerer Ring den Kernporenkomplex (42).

Darnell et al vergleichen aufgrund der Durchsetzung der Kernmembran mit Kernporenkomplexen die Kernmembran treffend mit einem molekularen Sieb (26).

Im Kern, geschützt vor mechanischen Einflüssen aus dem Sarkoplasma, wird die genetische Information, d.h. DNA an Histone und andere Strukturproteine gebunden, als Chromatin vorgefunden. Die doppelsträngige DNA wird eng gebunden an Histone verpackt und wickelt sich zu einer Fibrille von 10 nm, die durch erneute Faltung und Spiralisierung eine Chromatinfaser von 20-30 nm Durchmesser bildet (42). Eu- und Heterochromatin wird unterschieden, wobei Euchromatin die transkriptionsaktive Form darstellt und als Summe aller entspiralisierten Chromosomenabschnitte verstanden wird. Euchromatin gibt keinen oder nur geringen Kontrast im Elektronenmikroskop. Heterochromatin hingegen als kondensierte und inaktive Form des Chromatins, tritt als deutlich kontrastiertes, elektronendichtes, granuläres, feinst disperses Material im Kern in Erscheinung und bildet im Bereich der inneren Membranoberfläche stark kontrastgebende Ansammlungen unter Aussparung der Kernporen (16, 42). Chromatinaggregate werden vorgefunden als peripheres oder marginales Chromatin im Bereich der inneren Kernmembran, Chromatincenter als Aggregate inmitten der nukleären Matrix, nukleolusassoziiertes Chromatin im

Bereich der Nukleolusperipherie und intranukleoläres Chromatin in Form von geringen Mengen DNA im Bereich des Nukleolus.

Die nukleäre Matrix enthält Euchromatin und filamentöse Matrix von geringer Dichte und zeigt sich als helles durchscheinendes Material (42). Sie beinhaltet Aktin und Myosin. Aktin stellt einen großen Teil der Non-Histon-Proteine dar. Der größte Anteil liegt in globulärer Form/G-Form und ein geringer Teil in filamentöser Form/F-Form vor. Aktinfilamente kommen in Nukleolusnähe und Membrannähe vermehrt vor (42).

Der Nukleolus ist in der Mitte des Kernes lokalisiert, von runder Form und kommt in normalen Zellen einzeln vor (38). Er tritt elektronenmikroskopisch mit starkem Kontrast in Erscheinung und ist zusammengesetzt aus Nukleolonema und dem filamentösem Center. Innerhalb des Nukleolonemas werden filamentöse, RNA haltige Zonen (Filamentdurchmesser 5 nm, Länge 30-40 nm) von granulären, RNA-haltigen Zonen (Granuladurchmesser 15-20 nm) differenziert (42, 98), die mit dem Nukleolonema ein netzartiges Gebilde unter Einschluß einzelner nukleoplasmatischer Anteile bilden. Der Nukleolus wird häufig umgeben von nukleolusassoziiertem Chromatin (42, 78).

4.2.2. Kernfunktion

Der Nukleus ist der Ort der Transkription, Bildung der mRNA als ersten Schritt zur Proteinbiosynthese (Translation), die wiederum im Sarkoplasma stattfindet (59). Daneben hat der Kern die Aufgabe des Splicings der Transkripte und deren Export in das Zytoplasma (96). Die direkten Transkriptionsprodukte (Prä m-t-rRNA) werden an Ribonukleoproteinkomplexe (Spliceosom) gebunden, einem RNA-Splicing, einer posttranskriptionalen Modifikation unterworfen, indem bestimmte Abschnitte der Nukleotidfrequenz entfernt werden. Erst nach Vollendung des Splicings wird der Ribonukleoproteinkomplex entfernt und die resultierende mRNA verläßt durch die Kernporen den Kern und erreicht im Sarkoplasma die Ribosomen (8). An den Ribosomen findet die Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine statt (Translation) (59).

Das fertige Protein wird teilweise in Vesikeln verpackt zu seinem Bestimmungsort transportiert (91). Auch der Kern erhält seine Proteine, wie Lamine, Histone, DNA- und RNA-Polymerasen, aus dem Sarkoplasma ins Nukleoplasma über energieabhängige Prozesse durch Rezeptorstimulation an den Kernporen (96).

Der Nukleolus enthält DNA-Loops von verschiedenen Chromosomen stammend, die multiple rRNA-Gene enthalten, als nukleäre Organizer-Region bezeichnet. Seine Hauptfunktion ist die ribosomale RNA-Synthese, die Untereinheiten der Ribosomen

werden ins Sarkoplasma transportiert und dort aktiviert zu funktionellen Ribosomen (8).

Das elektronenmikroskopische Bild wird folgendermaßen mit diesen Funktionen korreliert: Das filamentöse Center stellt DNA dar, die nicht aktiv transkribiert wird, die filamentösen Zonen enthalten RNA-Moleküle im Syntheseprozess (Precursor-rRNA), während die granuläre Komponente eine Ansammlung von partiell komplettierten Precursor-rRNA-Partikeln ist (8, 42).

Der Nukleolus wird von Alberts et al aus dieser dargestellten Funktion heraus als Ribosomen-produzierende Maschine bezeichnet (8).

4.3. VERÄNDERUNGEN DER KERNGRÖSSE UND -FORM

Die hier dargestellten morphologischen Veränderungen der Kerngröße und bizarren Form finden in der Literatur in Fällen der klinischen aber auch experimentellen Hypertrophie Bestätigung. Rowan et al (80) beschreiben die Zunahme des nukleären Areals bei DCM. Die Vergrößerung der Kerne wird von Diener aufgeführt bei gleichzeitiger Verringerung der Volumendichte der Kerne, die zu einer Reduzierung der Kern/Zytoplasmarelation führt. Dies ist als unvollständige Anpassung der Kerne an den Bedarf der Myozyten zu werten und könnte für das Fehlen der Myofilamente verantwortlich sein (30).

Gwathmey (47) und Huhn et al (51) korrelieren die pathologischen Veränderungen des Nukleus mit dem Erkrankungs- und Hypertrophiegrad. Eine Aussage dieser Art ist hier nicht möglich, weil alle Patienten sich im Endstadium der Erkrankung befanden.

Zwar werden in der Literatur Formanomalien beschrieben, aber nicht in der hier dargestellten Vielfalt und Intensität, wo es zu brückenbildenden Kerngebilden, zu zerklüfteten Kernen mit etlichen Fragmenten/Anschnitten kommt. Bizarre Kerne werden von Toussaint et al (97) bei Hypertrophie des Myokards infolge von Pulmonalstenosen und Fallotscher Tetralogie sowie auch bei Rochoael et al (79) bei einem Kind mit DCM infolge viraler Infektion beobachtet. Ghadially erläutert Kernformaberrationen als Möglichkeit des Kernes, vermehrt mit dem Zytoplasma zu interagieren und erhöhte synthetische Aktivität zu erzielen (42).

Häufig wurden Kerne gesichtet, die aus mehreren Fragmenten zu bestehen scheinen. Auch kommen ähnlich große Kernanschnitte getrennt von sarkoplasmatischen Organellen nebeneinander vor. Da diese nicht membranös verbunden sind, könnte es sich um mehrere Kerne handeln.

Schupbach et al führen Doppelkernzählungen auf, um eine reaktive von einer primären Hypertrophie zu unterscheiden, weil Doppelkerne bei DCM reduziert seien (88). Nach unseren Untersuchungen ist die Anzahl der doppelkernigen Zellen bei DCM jedoch nicht verändert.

Auch die tiefen Einziehungen der Kernmembran könnten an einen von der Separierung betroffenen Kern denken lassen im Sinne einer amitotischen Teilung. Perennec et al zeigen solche Konstriktionen im mittleren Nukleusdrittel auf und gründen diese auf Fusionsprozesse (74). Cluzeaud et al beschreiben als Overloadfolge zwei Kerne in unmittelbarer Nähe aneinandergeschmiegt als Zeichen der Amitose oder Fusion (25).

Entgegen der allgemeinen Meinung, daß der Myozyt eine terminal ausdifferenzierte Zelle ist (3), betonen Anversa et al (10, 11) und Capasso et al (24) die beibehaltene Fähigkeit zur Mitose des erwachsenen Myozyten als Kompensationsmechanismus für Gewebszerstörung und Zellverlust.

Es müßte infolge der mitotischen oder amitotischen Aktivität bei DCM zur Erhöhung der Kernzahl im Gewebe kommen. Da aber die Anzahl der mononukleären Myozyten von ca. 95% zu 5% binukleären Myozyten sich im Kontrollgewebe zu DCM-Gewebe nicht verändert (13), scheint eine Fusion, Amitose oder Mitose nicht stattzufinden. Auch Anversa et al gehen von einem gleichbleibenden Verhältnis von mono- zu binukleären Zellen aus und betonen die gleichbleibende Kernanzahl von gesundem zu hypertrophem Myokard (9). Außerdem konnten wir trotz der Vielzahl an dokumentierten Kernen keine mitotischen Figuren nachweisen.

Baroldi et al interpretieren die hohe Zahl von doppelkernigen Myozyten bei Hypertrophie als Problem der Schnittrichtung bei stark verzweigten Kernen (15).

Die scheinbare Separierung wird daher als Pathologie der Kernform, Membranfaltung und Schnittrichtungsphänomen gewertet und nicht als Vorgang der Kernverdoppelung interpretiert.

Für die Festlegung der Mehrkernigkeit sind lichtmikroskopische Untersuchungen zweckmäßiger, weil es zur Darstellung des gesamten Kernes kommt, hingegen bei der Elektronenmikroskopie immer aufgrund der Schnittdicke nur Kernanschnitte begutachtet werden können.

4.4. PERINUKLEÄRES AREAL

Die Aufweitung des perinukleären Raumes, wie sie auch bei den DCM-Patienten aufgefunden wurde, wird von Ferrans et al als unspezifisches Hypertrophiezeichen und degenerative Veränderung des Myozyten gewertet (35). Kajihara et al vermuten,

daß die Aufweitung des perinukleären Areals ein Zeichen für eine Ansammlung von niedermolekularen Elementen im Sarkoplasma und Vorbereitung für die Synthese von kontraktile Elementen sei. Die gleichzeitige Vergrößerung des Kernes würde der Synthese von Myofilamenten vorausgehen (54).

Bei den DCM-Patienten liegt jedoch eine Verminderung des Myofibrillengehaltes vor, so daß zwar die Aufweitung des perinukleären Areals als Hypertrophie zu deuten ist, jedoch nicht als Zeichen einer erfolgenden erhöhten Synthese von Myofilamenten erklärt werden kann. Die Diskrepanz zwischen der erforderlichen und der erfolgten Syntheseleistung des Kernes wird auch im folgenden noch aufgezeigt werden.

4.5. POLYPLOIDISIERUNG DES KERNES

Die Vergrößerung des Kernes wird auf eine Polyploidisierung des DNA-Gehaltes zurückgeführt (3, 21, 86, 102).

Es wird von Kajihara et al schon in frühen Phasen der Hypertrophie eine nukleäre Vergrößerung als Vorläufer zur Vermehrung der Synthese der Myofilamente aufgefunden (54). Adler zeigt die Entwicklung der Ploidiestufen in der Herzentwicklung auf vom diploiden Chromosomensatz von Geburt zum Überwiegen der tetraploiden Kerne im Erwachsenenalter durch den Reiz der erhöhten funktionellen Beanspruchung (2, 5). Im Falle der Hypertrophie kommen bis zu 32c Kerne vor (4). Die erhöhte zytoplasmatische Leistung und dadurch erhöhte Proteinbiosynthese führt auf dem Weg der Rückkopplung zur Vermehrung der genetischen Information/Polyploidisierung. So kommt es mit steigendem Herzgewicht zu zunehmender Polyploidisierung der Myozytenkerne (1).

Der Mechanismus der Myozytenhypertrophie ist noch unbekannt (11). Eine chronische Überlastung gilt als Trigger der DNA-Synthese (24, 70), und die resultierende Hypertrophie ist mit Polyploidie assoziiert (102).

Da die DCM-Patienten erhöhte enddiastolische Füllungsdrucke aufweisen, müßte hier die Überlastung, unabhängig von dem sonst auslösenden Pathomechanismus, eine zusätzliche Erhöhung der DNA-Synthese zur Folge haben.

Brodsky et al korrelieren einzig den Overload der Ventrikel mit Polyploidie, sonst ist der Grad der Hypertrophie nicht mit dem Polyploidiegrad in Beziehung zu setzen. Die Größe des Myozytengenoms wird als wichtiger Parameter unter der Bedingung des exzessiven Herzwachstums angesehen, je größer der Polyploidiegrad des Herzens ist desto größer ist die Wachstumsreserve des Herzmuskels unter pathologischen Bedingungen (22).

Die Polyploidisierung wird von Brodskii als Überlebensstrategie des Herzmuskels verstanden (21).

Im Tierversuch mit Ratten konnte bei experimentell induzierter Hypertrophie keine Korrelation zwischen Nukleusgröße und Polyploidiegrad festgestellt werden (41, 57). Gerdes et al zeigen auf, daß die Kerne bei Hypertrophie zwar vergrößert sind, aber keine Zunahme des Polyploidiegrades zu vermerken sei. Die Volumenzunahme der Kerne wird zu der Reorganisation der Eu- und Heterochromatinanteile in Beziehung gesetzt (41).

In diesem Zusammenhang sind unsere Befunde der Vergrößerung der Kerne, bei gleichzeitiger Reduktion der Volumendichte der Kerne bei DCM (30), wichtig in Korrelation mit der durch die Fluoreszenz-Feulgen-Färbung nachgewiesenen reduzierten DNA-Konzentration bei gleich bleibendem DNA-Gehalt der Kerne zu setzen (s. Abb. 38). Das bedeutet, daß der Kern gegenüber normalen, gesunden Kernen eine noch geringere DNA-Konzentration und einen im Verhältnis zu geringen DNA-Gehalt aufweist, obwohl der Myozyt stark vergrößert ist und seine Größe eine Erhöhung der Transkription und Translation erfordern würde.

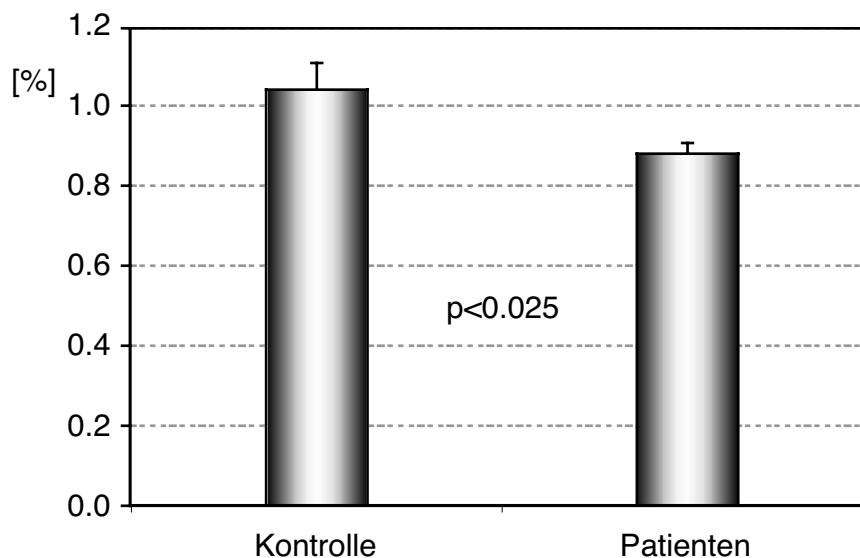


Abb. 38: Mittlere Volumendichte der Kerne von DCM-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe; Quelle: W. Diener (30).

Von Grove et al wird aufgezeigt, daß bei chronischer Hypertrophie zwar die DNA-Konzentration gegenüber der des Kontrollgewebes reduziert ist, jedoch der absolute DNA-Gehalt vergrößert ist (46). Trotz einer Polyploidisierung wird zeitgleich die DNA-Konzentration verringert im Sinne eines Verdünnungseffektes, vor allem bei lang bestehender Hypertrophie (46, 101).

Die in dieser Arbeit dokumentierte Größenzunahme und Formvarianz der Kerne kann demnach nicht aus der Vergrößerung des DNA-Gehaltes resultieren. Eine

Reorganisation des Chromatins und dadurch erhöhten Platzbedarf für die entspiralisierten DNA-Moleküle wird insofern als Ursache für die Größenzunahme abgelehnt, als auch Kerne, die elektronenmikroskopisch alle Anzeichen einer reduzierten Synthese tragen, deutliche Vergrößerung und Formanomalien aufweisen. Zumindest bei diesen Kernen müssen Größen- und Formvarianzen aus einem anderen zugrundeliegenden Pathomechanismus resultieren.

In dieser Arbeit kann aufgezeigt werden, daß bei DCM keine Verdünnung im klassischen Sinne auftritt, sondern eine wirkliche Reduktion der DNA-Konzentration im Vergleich zu normalem Myokard stattfindet bei nicht vorhandener Polyploidie, bei einem zeitgleich zu kleinen Kern im Verhältnis zum großen Myozyten.

Der Kern bei DCM hat demzufolge keine eigentliche Wachstumsreserve mehr und die von anderen hypertrophen Kernen ausgenützte Polyploidisierung steht ihm zur adäquaten daraus resultierenden Syntheseleistung nicht zur Verfügung.

4.6. CHROMATINVERTEILUNG UND TRANSKRIPTIONS-AKTIVITÄT

Aufgrund der dargestellten Reduktion in der DNA-Konzentration der Kerne bei DCM wäre zu klären, ob denn diese Kerne transkriptionsaktiv sind. Von Diener et al (29), Hein et al (50) und Perennec et al (73) wird bei Auftreten von Kernveränderungen eine Verminderung der Regulation der Transkription und daraus resultierend eine zu geringe Produktion von kontraktilem Material für die Herzinsuffizienz verantwortlich gemacht.

Majno et al beschreiben einen großen, kontrastarmen Kern als transkriptionsaktiv, einen großen, kontrastreichen Kern als von exzessivem DNA-Gehalt und dagegen einen kleinen, kontrastreichen Kern als transkriptionsinaktiv (63).

Wie auch das sonstige Myokard gleichzeitig verschiedene Veränderungen aufweist, zeigen die hier untersuchten Kerne unterschiedliche Chromatinverteilungen.

Die Mehrzahl der Kerne stellt sich kontrastarm dar mit geringer Margination des Heterochromatins, hier wird auf eine transkriptionsaktive Kernform geschlossen.

Daneben werden Kerne mit deutlichen Heterochromatinverschmelzungen aufgefunden, die als inaktiv gedeutet werden.

Des weiteren werden extrem kontrastarme Kerne, die auch vergrößert sind, aufgefunden, die nach der Definition von Majno et al transkriptionsaktiv sein müßten. In diesen Kernen sind nur selten Nukleoli angeschnitten und nur von geringer Größe. Es wird vermutet, daß es sich bei diesen Kernen um das elektronenmikroskopische

Korrelat eines Kernes mit zwar festgestellter hoher Transkriptionsaktivität, aber gleichzeitig nicht intaktem Nukleolus handelt als Ausdruck einer Störung in der Steuerung Transkription zu Translation. Es wird auf diese Problematik bei der Besprechung der Nukleoluspathologie noch näher eingegangen werden.

Adler et al zeigen lichtmikroskopisch das Verschwinden der heterochromatinhaltigen Chromocenter bei intensivem Herzwachstum und bei Hypertrophie auf, als Zeichen der „Euchromatinisierung“ (6). Damit befinden sich die Kerne im genetisch aktiven Zustand (82).

Weiterhin wird eine extrem kontrastreiche Kernform beschrieben. Diese wird als Ischämieschaden gedeutet. Ischämie löst klassische Veränderungen der Ultrastruktur aus, wie sie von Schaper et al (83) beschrieben wurden. Es kommt zur Aufhellung der nukleären Matrix, zur Verklumpung des Chromatins mit erhöhter Randständigkeit bei Vorliegen eines intranukleären Ödems. Die Mitochondrien zeigen eine Auflösung der Cristastruktur bei Verschwinden der Matrixgrana.

Aufgrund der starken Dilatation der Ventrikel bei DCM könnte es sich um einen ischämischen Schaden infolge nicht ausreichender Perfusion des Myokards durch die Koronararterien handeln, resultierend aus der Verlängerung und Zunahme der O₂-Diffusionsstrecke. Warmuth et al weisen Schädigung des Myokards durch Ischämie bei hypertrophierten Herzen oberhalb des kritischen Herzgewichtes nach (104).

Ein Fixierungsfehler ist auszuschließen, weil in derselben Gewebeprobe auch nicht ischämisch geschädigte Kerne aufgefunden werden.

Die des weiteren aufgefundenen Kerne mit aggregierten Chromatinanteilen in einem Kernareal werden als beginnende Desintegration des Chromatins auf dem Weg zum Myozytenuntergang durch Apoptose gewertet. Die umgebenden Organellen, insbesondere die Mitochondrien zeigen sich dicht gepackt ohne besondere Auffälligkeiten. Apoptose tritt charakteristisch an einzelnen Zellen auf und beginnt durch dicht gepackte, klar begrenzte Massenansammlung innerhalb des Kernes angelagert an die Membran (42, 58). Die Massen bestehen aus fragmentierten Chromatinmolekülen, die durch endogene Endonukleaseaktivität entstehen (105). Erst dann kommt es zur tiefen Einziehung der Kernmembran, zur Fragmentation des Kernes, und „Apoptotic Bodies“ bilden sich aus den restlichen Organellen und Kernfragmenten (62). Apoptose wird als aktiver Prozeß zur physiologischen Regulation von Gewebe angesehen (103). Liu et al erkennen Apoptose als zugrundeliegenden Mechanismus für End-stage-Herzinsuffizienz an (61). Diese Frage kann in dieser Arbeit nicht grundsätzlich geklärt werden, da nur wenige für Apoptose typische Kernformationen gefunden wurden.

Innerhalb des Chromatins wird bei DCM in dieser Arbeit das gleichzeitige Auftreten von Peri- und Interchromatingranula beschrieben.

Perichromatingranula kommen nach Ghadially in den Randbereichen der Heterochromatinansammlungen vor, und sie sind von einem chromatinfreien Hof umgeben (Durchmesser 30-35 nm, incl. Hof 75 nm) (42). Es wird diskutiert, daß sie aus mRNA-Filamenten bestehen, möglicherweise dem Nukleolus entstammend. Sie werden sowohl in Tumorzellen nach Gabe von Zytostatika als auch in Zellen vermehrt aufgefunden, bei denen entweder chemisch oder durch die vorliegende Grunderkrankung die Proteinbiosynthese gestört oder inhibiert wurde. Das Auftreten der Perichromatingranula gilt daher als Zeichen einer aberrierenden Proteinbiosynthese (42).

Interchromatingranula sind kantige Gebilde, häufig in Ansammlungen auftretend, mit durchschnittlichem Durchmesser von 15-50 nm, und ihr Vorkommen wird gehäuft in Tumorzellen festgestellt. So wird das vermehrte Auftreten von Interchromatingranula in der Carcinogenese der Rattenleber als auffälligstes Merkmal registriert. Ihre Zusammensetzung ist unklar, sie enthalten phosphorylierte Proteine und wahrscheinlich geringe Mengen RNA (42).

Ghadially zeigt mit vermehrtem Auftreten dieser Granula auch Nukleolusdesintegrationen im Sinne eines Zerfalls in die Komponenten auf (42). Ferrans et al beschreiben bei kongestiver Kardiomyopathie (zugrundeliegende Virusmyokarditis) das Vorliegen von Perichromatingranula bei gleichzeitigem Auftreten von Desintegration des Nukleolus. Für die Bedeutung der Trennung der fibrillären von der granulären Komponente des Nukleolus wird von Ferrans et al keine Erklärung angeführt (35).

Cluzeaud et al beschreiben Interchromatingranula bei einer lang bestehenden Hypertrophie und resultierender Polyploidie infolge Overloads (25).

Die bei unseren Patienten aufgefundenen Interchromatingranula sind sicher ein Zeichen der hoch transkriptionsaktiven Kerne. Das gleichzeitige Auftreten vermehrter Perichromatingranula kann nur so gedeutet werden, daß eine gestörte Proteinbiosynthese vorliegt. Wir vermuten, daß die Kerne, die diese Phänomene aufzeigen, gerade sich im Zustand befinden, die Transkription zu reduzieren, obwohl sie vorher überaktiv waren.

Die im Elektronenmikroskop nachgewiesene Transkriptionsaktivität findet auch in der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung dieser Arbeit Bestätigung. Durch die Markierung der Kerne mit Anti-Splicing-Faktor SC-35 werden die Kerne hervorgehoben, deren DNA transkribiert wurde, deren Transkripte einem Splicing

unterzogen werden, um nur noch Proteine kodierende mRNA zu erhalten und die Introns ohne nennenswerte Information zu eliminieren.

Deutlich wird, daß die Kerne bei DCM im gleichen Maße wie die des normalen Myokards transkribieren, obwohl ihre DNA-Konzentration deutlich reduziert ist und keine Polyploidisierung stattgefunden hat. Damit versucht der Kern durch Transkription der vorhandenen DNA den Verlust an genetischer Information und damit an Synthesekapazität zu kompensieren. Jedoch würde die Größe des Myozyten bei DCM und der Verlust an kontraktilem Material nicht nur eine Transkriptionsrate wie bei einem gesunden Myozyten, sondern eine deutlich erhöhte Rate erfordern, um regenerative Prozesse stattfinden zu lassen.

Die regenerative Wachstumskapazität und das proliferatives Potential sind beim erwachsenen Myokard sehr eingeschränkt (94).

Brodsky et al erläutern, daß die Polyploidie unter normalen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spiele, weil aus einem minimalen Genom eine normale Leistung resultieren kann. Unter pathologischen Situationen ist die Polyploidie wichtig, um dem erhöhten Synthesebedarf des Myozyten gerecht werden zu können. Während das Genom sich im Verhältnis von 2:4:8:16... erhöht, findet eine Erhöhung des Proteingehaltes im Verhältnis von 2:3:5:8... statt (22).

Die in dieser Arbeit untersuchten DCM-Patienten können im Umkehrschluß aufgrund der reduzierten DNA-Konzentration und fehlender Polyploidie nur deutlich verringerte, und auf keinen Fall eine zur Größe der Myozyten adäquate Proteinsynthese und dadurch einen reduzierten Proteingehalt aufweisen. Demnach liegen zwar transkriptionsaktive Kerne vor, die aber nicht mehr in der Lage sind, in ausreichender Menge Proteinsynthese zu initiieren.

4.7. MEMBRANAUFFÄLLIGKEITEN

Unterschiedliche Membranaberrationen wurden bei DCM in dieser Arbeit dargestellt.

4.7.1. Membranverlauf und Pseudoeinschlüsse

Die äußere Kernmembran steht mit dem Z-Streifen der Myofibrillen über zytoskeletale Filamente (100 Å) in Verbindung. Die Verbindung von äußerer Kernmembran zu sarkoplasmatischem Retikulum und das den Kern umrundende Netzwerk aus Mikrotubuli stabilisieren den Kern in seiner Position im Myozyten. Kontraktionen wirken sich daher auf die Kernform aus (36).

Teilweise werden Faltungen der Membran, wie in dieser Arbeit beschrieben, auf Kontraktionszustände des Myokards zurückzuführen sein, wie von Bloom et al dargestellt wurde (17). Die Kernlänge wurde deshalb auch nicht absolut bestimmt, sondern anhand der Sarkomerlänge dargestellt. Eine Relation herzustellen ist durch mögliche Kontraktionsartefakte reeller als die absolute Vermessung eines gestauchten Kernes. Die deutlich geschwungenen Membranverläufe der DCM-Gruppe können aber aufgrund ihres Nichtauftretens in der Kontrollgruppe nicht nur auf Fixierungsartefakte beruhen. Das Ausmaß der Membranwindungen übersteigt bei weitem das für Kontraktionen verantwortliche Maß (36). Die Membranverläufe in der vorgefundenen Art werden auch von Ferrans et al (36), Olsen (71), Kajihara et al (54) und anderen bei Hypertrophie unterschiedlicher Genese nachgewiesen. Ghadially beschreibt Aberrationen durch virale Infektionen (42), Viruseinschlüsse konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Sobel et al bezeichnen nukleäre Faltungen als zytoplasmatische Invaginationen infolge Schwellung oder Vergrößerung des zytoplasmatischen Inhaltes bei Tumoren (93). Bei unseren Patienten spricht die dargestellte reale Vergrößerung des Kernes und die noch zu besprechenden sonstigen Membranproliferationen innerhalb des Kernes gegen diese These. Ferrans et al (36), Engedal et al (32), Rochael et al (79) und Toussaint et al (97) weisen die Bildung von Membranfaltungen und Einschlüssen von zytoplasmatischem Material durch Invaginationen der Kernmembran, im folgenden als Pseudoeinschlüsse bezeichnet, nach. Diese sind charakteristisch von zwei Membranen begrenzt, die innere mit Ribosomen, die äußere mit umgebendem Heterochromatin besetzt, entsprechend dem Aufbau der nukleären Membran. Deutliche Größenunterschiede werden beobachtet, so daß der Einschluß von unterschiedlichsten Zellorganellen möglich wird (42). Membranfaltungen und Pseudoeinschlüsse werden von Ferrans et al (36) und Toussaint et al (97) als Konsequenz einer exzessiven Kernmembransynthese bei Hypertrophie angesehen.

Bei DCM werden, wie dargestellt, exzessive Membranen gebildet, die zu Kernkonfigurationen mit Brückenbildungen aus membranösen Bestandteilen führen.

4.7.2. Intranukleäre Tubuli

Intranukleäre Tubuli wurden von uns bei DCM vorgefunden.

Ferrans et al weisen intranukleäre Tubuli bei Hypertrophie des Herzens nach, die immer an Kernen vorkommen, die Pseudoeinschlüsse und deutliche Membranfaltungen aufweisen. Die Tubuli haben gerade, zylindrische Form und sind von dichter als sonst gepacktem marginalem Chromatinsaum umrundet (36). Engedal et al (32) betonen zusätzlich das Vorliegen in heterochromatinreicher Matrix von dicht gepackten Tubuli in unterschiedlicher Größe.

Entgegen den von Ferrans et al (36) zylindrisch und gerade Verläufe nehmenden Tubuli, den von Engedal et al (32) beschriebenen U-förmigen Tubuli werden bei dem vorliegenden Patientengut auch ringförmige Tubuli aufgefunden. Als Besonderheit kommen diese einerseits neben Einschmelzungen aus feinst filamentärem Material und andererseits neben einer Kettenbildung durch Tubuli vor. Ferrans et al (36) und Engedal et al (32) deuten diese Tubuli als überschießende Membranbildung durch die innere Kernmembran, während die äußere Membran von dieser Änderung nicht betroffen ist. Die innere Kernmembran proliferiert demnach in die nukleäre Matrix hinein, möglicherweise als Reaktion auf kardiale Hypertrophie.

Engedal et al zeigen auch Kernporen ähnliche Strukturen in tubulireichen Arealen auf, allerdings ist das Verschmelzen der Tubulimembranen im Längsschnitt der zylindrischen Tubuli (32). Die bei der DCM-Gruppe aufgefundenen Kernporen innerhalb eines Tubulus sind Querschnitte durch Porenkomplexe mit und ohne zentralem Knötchen. Der klassische Porenaufbau durch Verschmelzen der äußeren mit der inneren Kernmembran kann aufgrund des Tubulieaufbaus nur aus innerer Membran nicht vorliegen. So scheint die innere Kernmembran allein fähig zu sein, komplette Porenkomplexe zu strukturieren und zu bilden. Eine derartige Häufung von Porenkomplexen wurde an keiner weiteren Membranstruktur in dieser Gruppe von Patienten aufgefunden. Die Häufung von Porenkomplexen wird im Rahmen von erhöhter DNA-Synthese, nukleärer Volumenerhöhung und Erhöhung der Kernoberfläche beschrieben (42). Aufgrund des Vorkommens von Kernporen ist von einem Substrataustausch zwischen nukleärer Matrix und Tubulilumen auszugehen.

4.7.3. Intranukleäre Kompartimentbildung

Des weiteren wurde in der DCM-Gruppe ein hohlraumbildendes Membransystem aufgefunden, das als Kompartimentbildung bezeichnet wurde.

Entgegen den von Ferrans et al (36) und Engedal et al (32) beschriebenen Strukturen sind die Hohlräume zwar teilweise von Heterochromatin angeheftet an die Lamina begrenzt, sie liegen aber nicht in heterochromatinreicher Matrix. Sie sind deutlich größer als die intranukleären Tubuli und führen zur quasi Separierung ganzer eingeschlossener nukleärer Matrixanteile. Längliche, konzentrische und amorphe Kompartimente wechseln sich in unregelmäßiger Reihenfolge ab. Auffallend ist die nur teilweise Begrenzung mit Membran, Lamina und Heterochromatin. Es kommt in größeren Abschnitten zu nur membranöser Separierung. Dort wo Heterochromatin und Lamina fehlen, kommt es zu Aussackungen und Vergrößerung des nur membranös umgrenzten Lumens. Die Kompartimente weisen entgegen den dargestellten intranukleären Tubuli keine oder nur geringe Auffüllung mit unspezifischem Material auf. Solche Hohlraumbildungen wurden bis jetzt nicht in der

Literatur beschrieben. Die Bedeutung dieser Kompartimente scheint auch in einer gestörten Membranfunktion und möglicherweise in einer strukturellen Laminastörung zu bestehen, die noch zu besprechen ist.

4.7.4. Unvollständige membranöse Separierung

Die membranöse Separierung der Kerne vom Sarkoplasma ist bei der Gruppe der DCM-Patienten gestört und nicht vollständig.

Einzelne Kerne mit teilweise erheblich überschießender Membranproduktion wie der aufgezeigte kometenartige Kern im Bereich des „Kometenschweif“, zeigen an Kernarealen eine vollständige Unterbrechung der Kernmembran auf. Membranunterbrechungen wurden auch an Pseudoeinschlüssen aufgefunden, die dadurch teilweise wie Einschlüsse erscheinen.

Ein mögliches Zerreißen der Membran durch Fixierungs- und Schnitttechnikfehler wird aufgrund intakter sonstiger sarkoplasmatischer Organellen als unwahrscheinlich erachtet. Ein Auflösen der Kernmembran durch mitotische Aktivitäten hätte auch entsprechende Auffälligkeiten im Nukleolusbereich zur Folge, die aber nicht beobachtet werden konnten.

Statt von einer Desintegration bestehender Membrananteile auszugehen, könnte die Neubildung von komplett desintegrierten Kernmembranen angedacht werden. Es konnte allerdings anhand der unvollständig separierten Pseudoeinschlüsse aufgezeigt werden, daß es sich um desintegrative Prozesse der bestehenden Membran handeln muß, dadurch, daß Sarkoplasma und Organellen im Kern zu liegen kommen.

Stellenweise unterbrochene Membranen werden von Jensen et al aufgezeigt, aber kein zugrundeliegender Pathomechanismus angegeben (53).

4.7.5. Intranukleäre Einschlüsse

Mitochondrien, Vakuolen, membrangebundene und membranlose Strukturen werden in der DCM-Gruppe intranukleär aufgefunden. Filamentäres Material kommt intranukleär, aber auch in der kernumgrenzenden Zone vor.

Ferrans et al halten eine Auflösung einer Kernmembran nach der Bildung eines Pseudoeinschlusses infolge exzessiver Membranfaltung unter außergewöhnlichen Umständen für möglich (37). Die nur teilweise membranös separierten Pseudoeinschlüsse würden das ultrastrukturelle Korrelat einer solchen Auflösung darstellen.

Eine Auflösung der Kernmembran im Bereich des Kontaktes mit Lipid wird von Ghadially beschrieben, so daß Lipid zunächst als Pseudoeinschluß im Kern aufgefunden wird und dann durch Lyse der Membran in die nukleäre Matrix freigelassen wird (42).

Ein Einschluß von Organellen während einer abnormalen Mitose wird von Jensen et al aufgrund des Fehlens von mitotischen Figuren im Myokard verneint (53).

Eine weitere Möglichkeit wurde angedacht, daß zytoplasmatische Organellen, z.B. Mitochondrien, durch massive Aufdehnung der Kernporen die Kernmembran penetrieren (42). Aufgrund der bekannten ringförmig begrenzten und nicht unbegrenzt dehnbaren Kernporenstruktur ist offensichtlich, daß die Kernpore für sarkoplasmatische Organellen nicht zu passieren ist und nur selektiv von Molekülen zu penetrieren ist (37).

Eine de novo Synthese von intranukleären Mitochondrien oder eine Synthese aus Nukleusmembranen wird von Jensen et al angenommen (53).

Eine Golgikomplex-ähnliche Struktur wurde von Bucciarelli in einer neoplastischen Zelle intranukleär aufgefunden und als Resultat pathologischer Membranbildung durch die innere Kernmembran erläutert (23).

Oyer et al zeigen intranukleäre Einschlüsse bei Kardiomyopathie auf bei gleichzeitigem Bestehen einer seltenen neuronalen Einschlußkrankheit (NIID) (72).

Die in den Kernen mit unterbrochener Membran aufgefundenen Mitochondrien könnten durch eine Penetration der membranlosen Abschnitte in der nukleären Matrix liegen. Fraglich ist jedoch, warum Kernmembranabschnitte unvollständig sind.

Jensen et al befürchten, mit Biopsienadeln die Kernmembran zu schädigen (53). Aufgrund der bereits dargestellten Gewinnung der Proben aus Explantaten kann daher eine solche Schädigung vernachlässigt werden. Demnach kann es sich bei den unterbrochenen Membranabschnitten an der Kernmembran im Bereich zum Sarkoplasma und innerhalb der Pseudoeinschlüsse nur um einen degenerativen Prozeß der Kernmembran handeln.

Der Einschluß von Organellen bei gleichzeitig intakter Membran kann auch in dieser Arbeit nur beschrieben werden und wird weiterhin Grund für Spekulationen bleiben.

Eine weitere Besonderheit stellt die Ansammlung im Sarkoplasma und intranukleär von feinst filamentärem Material dar. Im Sarkoplasma liegen häufig sehr große Areale dieses Materials, die deutlich größer als die Kernareale sind, während intranukleär geringere Bereiche eingeschlossen werden. Eine große Heterogenität besteht in der Lage im Kern, in Margination des umgebenden Chromatins, in Form

des Einschlusses und Häufigkeit des eingeschlossenen Materials. Auch die als rosettenähnlich bezeichnete Struktur erscheint aus diesem Grundmaterial in unterschiedlichen Ansammlungen aufgebaut. Das Material ist im kernumgrenzenden Areal membranös separiert mit einer einfachen Membran, die aber auch streckenweise fehlt. Im Kern ist eine Separierung durch Membranen nicht deutlich. In entsprechender Vergrößerung erscheint die Zusammensetzung aus feinsten Filamenten.

Ferrans et al zeigen solche Materialansammlungen auf, die sie aufgrund ihres lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes als basophile Degeneration Typ I bezeichnen. Diese 5 μm Durchmesser habenden länglichen Gebilde mit feiner granulärer Matrix sind möglicherweise aus glykogenähnlichen Polymeren der Glukose zusammengesetzt. Ihre Bedeutung ist unklar (34).

Von Perennec et al wird ein solches Material aus feinen Filamenten in Kernnähe aufgefunden bei kardiomyopathischen Syrien-Hamstern. Die Autoren erklären diese Substanzen als Abbauprodukt oder als Zeichen einer abnormalen Synthese (74).

Bei diesem Material könnte es sich um Abbauprodukte des Myozyten handeln, die entweder aufgrund einer Regulationsstörung des Abbaus oder aufgrund eines Auftretens großer Massen von Abbauprodukten bei gleichzeitigem, pathologisch verlangsamtem Abbau innerhalb des Myozyten angesammelt werden.

Denkbar wäre jedoch auch das Auftreten dieses fein filamentären Materials in Ansammlungen infolge einer überschießenden Syntheseleistung bei unzureichendem Abtransport aus dem Kern, möglicherweise eine Transportstörung der Kernmembran aufzeigend.

Auch der Einschlußmechanismus der stark kontrastgebenden rundlichen Strukturen, die an Lipideinschlüsse erinnern, verbleibt unklar. Wie schon dargestellt, wäre beim Vorliegen von Lipid das unregelmäßige Vorhandensein von Membranen durch Auflösungsprozesse bei Kontakt mit der nukleären Matrix zu erklären.

Wie auch bei den anderen Einschlüssen von zytoplasmatischen Materialien bleibt die Frage über den Mechanismus, der zum intranukleären Auftreten dieser Materialien führt, offen. Die Bedeutung scheint in einer degenerativen Kernalteration und damit resultierenden Veränderung des Myozyten zu liegen.

4.8. NUKLEÄRE EINSCHLUSSKÖRPERCHEN (BODIES)

Die bei den Patienten mit DCM aufgefunden nukleären Bodies werden in der Literatur als intranukleäre Strukturen mit unterschiedlicher Morphologie aufgeführt. Konzentrische, neben fibrillären, ringförmigen, sphärischen Strukturen werden

solitär, aber auch in Kombination vorkommend, beschrieben. Nur die einfach zusammengesetzten nukleären Bodies werden in physiologischem Gewebe aufgefunden. Komplexer aufgebaute nukleäre Bodies werden in diversen Tumorzellen, virusinfizierten, immunologisch oder hormonell stimulierten Geweben nachgewiesen. Die Funktion ist noch unklar. Nach entsprechender Stimulation konnte ein Wachstum/Knospen des Nukleolus mit resultierender Transformation dieser Ausläufer in fibrillogranuläre oder granuläre nukleäre Bodies hervorgerufen werden. Die Entstehung der nukleären Bodies aus Nukleoluskomponenten erscheint wahrscheinlich, und dem fibrillären Anteil der nukleären Bodies wird von daher RNA-Gehalt zugesprochen. Die nukleären Bodies gelten daher als Zeichen einer stimulierten oder synthetisch aktiven Zelle (42).

Die innerhalb der Patientengruppe mit DCM aufgefundenen nukleären Bodies sind demnach auch ein weiterer Marker für die synthetischen Aktivität des Kernes.

Im Gegensatz zu den nukleären Bodies, wie oben beschrieben, sind die von uns als Nukleäre-Bodies-ähnlich genannten Strukturen membranös durchsetzt und aus verschiedenem, kontrastgebendem Material gebildet. Die membranöse Separierung der Komponenten führt aber nicht zu einer vollständigen Abtrennung von der nukleären Matrix. Der von heterochromatinfreier Matrix gebildete Hof um diese Struktur ähnelt dem von den nukleären Bodies.

Dieses Phänomen wird als Aberration der Membranbildung, überschießende Reaktion der Membran bei gleichzeitig bestehender synthetischer Aktivität des Kernes, gedeutet.

4.9. PATHOLOGIE DES NUKLEOLUS

Die Nukleoli der an DCM erkrankten Patienten zeigen Mengen-, Größen-, Form- und Lageveränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Vergrößerung der Nukleoli werden allgemein als Zeichen einer erhöhten Syntheserate und erhöhter Polyploidie des Kernes angesehen (18, 25, 42, 60). Eine erhöhte Anzahl der Nukleoli resultiert aus der Polyploidie der Kerne, und die qualitative Ausbildung der Nukleoli leidet nicht unter dieser Vermehrung (67). Die Erhöhung des Genoms führt zur Vermehrung der Anzahl der nukleären Organizer Region mit daraus resultierender Erhöhung der nukleolären Masse pro Kern. Die Anzahl der aufgefundenen Nukleoli korreliert nicht unbedingt mit der Ploidiestufe, weil nukleoläre Fusionen stattfinden können (81). Eine Reduktion der Nukleolianzahl bei Zunahme der Ploidie der Zelle wird von Shea et al auf Fusion bestehender Nukleoli zurückgeführt, da das Volumen eines einzelnen Nukleolus gleich zu dem absoluten Volumen der Nukleoli in einem Kern mit mehreren Nukleoli ist (90). Adler weist bei

stark hypertrophierten Herzen bis zu zehn Nukleoli nach, betont die erhöhte Anzahl und Masse der Nukleoli als Zeichen für eine Steigerung der Proteinbiosynthese als Folge des größeren rRNA-Angebotes (4). Das Auffinden von vielen Nukleoli, dann aber von geringer Größe und von wenigen bei erhöhter Größe, wird von Meinders-Groeneveld et al bei der Rattenleber in verschiedenen Ploidiestufen aufgezeigt (66).

In experimenteller linksventrikulärer Hypertrophie wird als einer der ersten Reaktionen auf den Reiz eine Vergrößerung des Nukleolus registriert, bevor andere Organellen mit erhöhter Syntheseleistung reagieren (7).

Die bei DCM aufgefundenen Nukleoli korrelieren zum Teil mit diesen Aussagen, in dem Sinne, daß in einzelnen Kernen viele kleine Nukleoli und in anderen wiederum wenige große Nukleoli aufgefunden werden, jedoch im Gegensatz zu der Literatur werden diese bei reduzierter DNA-Konzentration und nicht vorhandener Polyploidie aufgefunden. Möglicherweise stellt diese Diskrepanz das ultrastrukturelle Korrelat des Versuches des Kernes dar, trotz reduzierter DNA-Konzentration eine ausreichende Transkription und damit Proteinbiosynthese aufrechtzuerhalten.

Wie im sonstigen Myokard zeigen auch die Nukleoli die bekannte Heterogenität der Befunde bei DCM auf.

Die deutlich vergrößerten Nukleoli (bis zu 6 Sarkomerlängen) bei DCM werden als Zeichen einer erhöhten synthetischen Aktivität gewertet. Ghadially zeigt deutliche Vergrößerung der Nukleoli bei Tumorzellen auf. Die bei DCM vorkommenden mehreren kleinen filamentösen Center sind als Aktivitätszeichen des Nukleolus zu deuten (42).

Als weitere Größenanomalie im Gegensatz dazu ist auffällig, daß sehr große, kontrastarme, transkriptionsaktive Kerne nur einen einzelnen kleinen Nukleolus von kompaktem Aufbau aufweisen. Sehr häufig können in diesen Kernen keine Nukleoli aufgefunden werden. Verkleinerte Nukleoli sind kompakt und lassen keinen klassischen Nukleoliaufbau mehr erkennen. Unverferth et al bezeichnen das Nukleolonema in diesem Fall als kollabiert (98). Kompakte Nukleoli werden als Zeichen einer reduzierten Proteinsynthese und Blockade der RNA-Produktion angesehen (98).

Eine Abnahme des Verhältnisses von Nukleoli zu Nukleus wird als Alteration der myokardialen Proteinsynthese mit resultierender Herzinsuffizienz von Leyton et al (60) gedeutet.

Regressive Veränderungen des Nukleolus finden statt, wenn eine ehemals aktiv Protein synthetisierende Zelle deaktiviert wird (medikamentös oder physikalisch). Der ringförmige Nukleolus, bei dem das Nukleolonema nur eine lose Umhüllung der filamentösen Center bildet, stellt eine solche regressive Form dar (42). Ringförmige,

U-förmige Nukleoli kommen bei DCM neben physiologischer Konfiguration in einem Kern zeitgleich vor.

Stark vergrößerte fibrilläre Center werden von Ghadially als Folge einer Inhibierung der Proteinbiosynthese oder morphologisches Korrelat einer sich im Ruhezustand befindlichen Zelle angesehen (42), auch solche Nukleoli konnten bei DCM nachgewiesen werden.

Innerhalb kondensiertem Heterochromatin, demnach in inaktiven Kernen, sind Nukleoli mit kollabiertem Nukleolonema aufzufinden, deren ursprünglicher Aufbau nur noch zu erahnen ist. Unverferth et al weisen solche Nukleoli bei Zytostatika induzierter CM nach (98).

Zur Desintegration der nukleolären Bestandteile kommt es bei den längsgeschwungenen Nukleolusverläufen. Desintegrationen der nukleolären Komponenten werden als Reaktion auf Antimetaboliten von Simard et al beobachtet und als Störung der DNA-abhängigen RNA-Synthese gewertet (92). Ferrans et al zeigen nukleoläre Desintegration bei Patienten mit DCM infolge Virusmyokarditis bei gleichzeitigem Auftreten von Perichromatingranula auf (35).

Das Auffinden von Nukleoli randständig an der Kernmembran gilt als Zeichen einer aktiven Proteinsynthese und wird auch bei schnell wachsenden malignen Tumoren aufgefunden (42).

Unverferth et al weisen durch die von ihnen gefundenen Nukleoluskonfigurationen bei DCM eine erhöhte RNA- und Proteinproduktion nach. Die Autoren verwendeten Biopsien und zählten zehn Kerne pro Patient (98).

Da eine Heterogenität der Befunde bei DCM bekannt ist, kann durch diese Art der Probengewinnung und die geringe Anzahl der gezählten Kerne ein solch nicht repräsentatives Ergebnis resultieren.

Entgegen der Untersuchungen von Unverferth et al liegen im Myokard bei DCM nebeneinander Nukleoli vor, die auf eine reduzierte und auf eine erhöhte synthetische Aktivität des Myozyten schließen lassen bei gleichzeitigem Vorkommen von Nukleoli, die aus Aktivitätsphasen in degenerative Prozesse überzugehen scheinen.

4.10. ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG UND ARBEITS-HYPOTHESE

Die morphologischen Veränderungen des Myozyten bei DCM sind mannigfaltig und betreffen alle Bestandteile des Myokards (85). Die in dieser Arbeit aufgezeigten

Befunde am Zellkern können teilweise mit den ultrastrukturellen Veränderungen bei Hypertrophie in Einklang gebracht werden.

Die Kernveränderungen im Sinne der pathologischen Membranstrukturen und der pathologischen Veränderungen des Nukleolus wurden in der Literatur bei DCM bis dato nicht aufgezeigt.

Es wird angenommen, daß die überschießenden Membranbildungen im Bereich der nukleären Matrix, der Nukleären-Body-ähnlichen Strukturen, die Brückenbildungen durch Kernmembran, die Membranunterbrechungen, die Auflösungserscheinungen an der Membran der Pseudoeinschlüsse und der zum Einschluß von sarkoplasmatischen Materialien führende Mechanismus das ultrastrukturelle Korrelat der biochemisch nachgewiesenen Störung im Aufbau der Lamina darstellt. Durch das Fehlen bzw. die Verringerung des Lamin B1 bei DCM resultiert ein gestörter Laminaaufbau. Da die Lamina verantwortlich ist für den Aufbau und die Form des Zellkernes, könnte eine Störung in einer ihrer strukturellen Untereinheiten zu den dargestellten Formaberrationen und zur Vergrößerung führen. Diese sind entgegen anderen Hypertrophieformen nicht durch den Platzbedarf eines polyploiden Chromosomensatzes zu erklären, weil die Reduktion der DNA-Konzentration und nicht vorhandene Polyploidie bei DCM hier aufgezeigt wurde.

In den beschriebenen Kompartimentbildungen zeigt sich die Folge der Abwesenheit der Lamina, in dem Aussackungen und Verbreiterungen der Hohlräume an diesen Bereichen zu verzeichnen sind.

Die innerhalb der nukleären Matrix aufgefundenen membranösen Veränderungen, die pathologische Vermehrung der Kernmembran und das Fehlen einer solchen in anderen Kernarealen können auch als Folge eines solchen strukturellen Lamina-problems gedeutet werden.

Da die Lamina auch für den Aufbau des Nukleolus mit verantwortlich ist, könnten auch die dargestellte Diskrepanz in Kerngröße zu Nukleolusgröße und die aufgezeigten pathologischen Nukleoluskonfigurationen Folge des unzureichenden Laminaaufbaus sein.

Die Produktion der rRNA und damit der Ribosomen im Zytoplasma durch den Nukleolus ermöglicht erst die Verwertung der im Kern erstellten Transkripte und damit die Proteinbiosynthese. Nukleoli, die Anzeichen einer supprimierten oder aberrierten Synthese aufweisen, werden in hochaktiv erscheinenden Kernen aufgefunden. Dies kann bedeuten, daß der Kern zwar möglicherweise in ausreichender Menge transkribiert, diese Transkripte aber infolge der Strukturstörung des Nukleolus nicht translatiert werden können, weil rRNA/Ribosomen fehlen.

Laminastörungen führen zur Replikationsstörung der DNA (28, 43), die Kettenverlängerung der DNA wird durch Störung der Laminorganisation, abhängig von deren Ausmaß, inhibiert (68, 95).

Möglicherweise sind die aufgezeigten intranukleären Einschlüsse unterschiedlichster Zusammensetzung auf eine solche Replikationsstörung zurückzuführen und resultierend daraus eine überschießende Produktion eigentlich nicht erforderlicher, atypischer Proteine bei gleichzeitigem Fehlen von überlebenswichtigen kontraktilen Proteinen die Folge.

Eine Entkoppelung von dem für den Myozyten essentiell erforderlichen Synthesebedarf und der eigentlichen Syntheseleistung scheint stattzufinden. Eine Rückkoppelung, wie sie bei anderen Hypertrophieformen abläuft, so daß eine erhöhte Leistungsanforderung zur Polyploidie führt, findet nicht statt. Auch der Overload führt nicht zur Erhöhung des Genoms.

Statt dessen konnte aufgezeigt werden, daß eine Verringerung der DNA-Konzentration zu verzeichnen ist und keine Polyploidie der Kerne vorliegt, also steht dem Myozyten trotz deutlicher Vergrößerung eine nur geringe, eingeschränkte Chromatinmenge zur Steuerung der Translation zur Verfügung.

Der Kern versucht mit allen ihm zur Verfügung stehenden Mitteln, diesen Fehler auszugleichen, indem er die Transkription auf das ihm mögliche Maß erhöht, was sich an den ultrastrukturellen Zeichen für eine erhöhte Transkription niederschlägt. Einige Kerne weisen aber auch hier schon „Ermüdungserscheinungen“ auf, weshalb Zeichen einer erhöhten, neben einer supprimierten Synthese nebeneinander vorkommen.

Die zelluläre Erschöpfung führt zu degenerativen Veränderungen des Myozyten (64).

Möglich wäre, daß die fehlende Rückkoppelung zwischen Sarkoplasma und Kern in einer gestörten Kernporenfunktion begründet ist, die ihrerseits aus der pathologischen Lamina resultiert. Eine Behinderung des die Kernmembran penetrierenden Stofftransportes würde zu einer Fehlleistung des Kernes führen und möglicherweise Ansammlungen von Materialien intranukleär zur Folge haben und erklären können.

Zusammenfassend scheint also eine funktionelle Aufbaustörung des Kernes bei DCM und eine gestörte Rückkoppelung zwischen Syntheseleistung und –bedarf ursächlich zur Entstehung der terminalen Herzinsuffizienz bei DCM zu sein.

5. Zusammenfassung

Die DCM ist eine Herzmuskelerkrankung mit bis heute unbekannter Ursache.

Obwohl etliche prädisponierende Faktoren verantwortlich gemacht werden zur Entstehung des Krankheitsbildes, ist der eigentliche Pathomechanismus noch unbekannt.

Die These, daß Kernveränderungen und eine gestörte Transkription für die Entstehung der DCM in Betracht kommen, wird in der Literatur vertreten.

Ziel der hier dargestellten Untersuchung sollte die systematische Darstellung der ultrastrukturellen morphologischen Veränderungen des Kernes bei DCM sein. Die mögliche Transkriptionsaktivität sollte verifiziert und der DNA-Gehalt quantifiziert werden.

Linksventrikuläres Myokard von sechs Patienten, die an DCM erkrankt waren und ein Insuffizienzstadium IV nach NYHA aufwiesen und die aufgrund dieser Indikation transplantiert wurden, wurde elektronenmikroskopisch untersucht.

Des weiteren wurden im Rahmen einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Fluoreszenz-Feulgen-Färbung zum Nachweis des DNA-Gehaltes der Kerne und eine Markierung der Kerne durch Inkubation mit Anti-Splicing-Faktor SC 35 zur Darstellung der Transkriptionsaktivität durchgeführt.

Die hier dokumentierten Ergebnisse des Myokards von an DCM erkrankten Patienten wurden den Befunden an normalem Myokard des linken Ventrikels gegenübergestellt.

Die Kerne der DCM-Patienten zeigten deutliche Veränderungen auf

- Vergrößerungen
- Formanomalien
- Aufweitung der perinukleären Zone
- Intranukleäre Einschlüsse unterschiedlichster Natur
- Membranproliferationen und -fehlbildungen
- Unterbrochene membranöse Separierung
- Pseudoeinschlüsse
- Intranukleäre Tubuli
- Intranukleäre Kompartimentbildung

- Aggregationen feinst filamentären Materials intra- und perinukleär
- Irregulärer Aufbau der Nukleoli
- Form-, Zahl- und Größenanomalien der Nukleoli
- Chromatinveränderungen, die als Marker für Ischämie und Apoptose gelten
- Peri- und Interchromatingranula

Die Bedeutung dieser ultrastrukturellen Veränderungen wurde dargestellt als einerseits Zeichen der Hypertrophie und andererseits als degenerative Erscheinungen der Kerne bei DCM.

Durch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Kerne bei DCM zwar transkriptionsaktiv sind, aber eine reduzierte DNA-Konzentration gegenüber normalem Myokard aufweisen und keine Polyploidie der Kerne der DCM-Patientengruppe vorliegt.

Die oben dargestellten Veränderungen, neben dem Ergebnis des im Verhältnis zu DNA-Gehaltes, wurden als Zeichen von Transkriptionsaktivität und gleichzeitig supprimierter Syntheseleistung interpretiert.

Es wird angenommen, daß durch Steigerung der Transkriptionsrate die Reduktion der DNA-Konzentration ausgeglichen wird. Diese Kompensation ist jedoch nicht vollständig, so daß eine reguläre Steuerung zwischen Proteinbedarf und Syntheseleistung nicht mehr stattfindet.

Als ursächlich für diese Kernstörung wird ein pathologischer Aufbau der Lamina und damit der strukturellen Untereinheit des Kernes verantwortlich gemacht.

Es wird angenommen, daß aus der Entkoppelung der Syntheseleistung des Kernes vom Bedarf des Myozyten, es resultierend zur strukturellen Störung des Myozyten kommt, die in der terminalen Herzinsuffizienz endet.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler CP, Sandritter W (1971) Numerische Hyperplasie der Herzmuskelzellen bei Herzhypertrophie. Dtsch Med Wochenschr 96: 1895-1897
2. Adler CP (1972) Polyploidisierung und Zellzahl im menschlichen Herzen. Fortschr Med 90: 671-675
3. Adler CP (1972) Morphologische Grundlagen der Herzhypertrophie und des Herzwachstums. Med Welt 23: 477-484
4. Adler CP (1975) Relationship between DNA-content and nucleoli in human heart muscle cells and estimation of cell number during cardiac growth and hyperfunction. In: P-E Roy, P Harris (eds) Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. The Cardiac Sarkoplasm, University Park Press, Baltimore USA, London England, pp 373-386
5. Adler CP (1976) DNA in growing hearts of children. Biochemical and cytophotometric investigations. Beitr Pathol 158: 173-202
6. Adler CP, Hartz A, Sandritter W (1977) Form and structure of cell nuclei in growing and hypertrophied human hearts. Beitr Pathol 161: 342-362
7. Aguirre G, Baba N (1969) Electron microscopic observations of experimental left ventricular hypertrophy. Lab Invest 20: 573 (abstr)
8. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1989) The Cell Nucleus. In: Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc., New York London, pp 483-546
9. Anversa P, Olivetti G, Melissari M, Loud AV (1979) Morphometric study of myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic stenosis. Lab Invest 40: 341-349
10. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Capasso JM (1990) Hypertensive cardiomyopathy: Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. J Clin Invest 85: 994-997

11. Anversa P, Fitzpatrick D, Argani S, Capasso JM (1991) Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart. *Circ Res* 69: 1159-1164
12. Arbustini E, Gavazzi A, Pozzini G, Grasso M, Pucci A, Campana C, Graziano G, Martinetti M, Cuccia M (1989) The morphologic spectrum of dilated cardiomyopathy and its relation to immune-response genes. *Am J Cardiol* 64: 991-995
13. Arnon E, Hein S, Kostin S, Bauer EP, Klövekorn W-P, Schaper J (1999) Continuous structural remodeling in the transition to endstage heart failure in human patients. *Circulation* 100 (Suppl I), 2948 (abstr)
14. Baandrup U, Florio RA, Roters F, Olsen EGJ (1981) Electron microscopic investigation of endomyocardial biopsy samples in hypertrophy and cardiomyopathy. *Circulation* 63: 1289-1298
15. Baroldi G, Falzi G, Lampertico P (1967) The nuclear patterns of the cardiac muscle fiber. *Cardiologia* 51: 109-123
16. Bloom W, Fawcett DW (1968) *A Textbook of Histology*. W.B. Saunders, Philadelphia London Toronto
17. Bloom S, Cancilla PA (1969) Conformational changes in myocardial nuclei of rats. *Circ Res* 24: 189-196
18. Bloom S, Egli D (1969) Variation of myocardial nucleolar abundance with heart weight. *Proc Soc Exp Biol (N.Y.)* 130: 1019-1021
19. Bosman F (1996) Nuclear structure and the lamins. *J Pathol* 178: 3-4
20. Bosman FT (1999) The nuclear matrix in pathology. *Virchows Arch* 435: 391-399
21. Brodskii VY (1995) Polyploidy in the myocardium and compensatory reserve of the heart. *Bull Exp Biol Med* 119: 435-440

22. Brodsky VY, Sarkisov D, Arefyeva AM, Panova NW, Gvasava IG (1994) Polyploidy in cardiac myocytes of normal and hypertrophic human hearts; range of values. *Virchows Arch* 424: 429-435
23. Bucciarelli E (1966) Intranuclear cisternae resembling structures of the Golgi complex. *J Cell Biol* 30: 664-665
24. Capasso JM, Bruno S, Cheng W, Li P, Rodgers R, Darzynkiewicz Z, Anversa P (1992) Ventricular loading is coupled with DNA synthesis in adult cardiac myocytes after acute and chronic myocardial infarction in rats. *Circ Res* 71: 1379-1389
25. Cluzeaud F, Perennec J, deAmoral E, Willemin M, Hatt PY (1984) Myocardial cell nucleus in cardiac overloading in the rat. *Eur Heart J* 5 (Suppl F): 271-280
26. Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1990) Organelle Biogenesis. In: J Darnell (ed) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., distributed by Freeman and Company, New York Oxford, pp 681-686
27. Dec GW, Fuster V (1994) Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 331: 1564-1574
28. Dessev GN (1992) Nuclear envelope structure. *Curr Opin Cell Biol* 4: 430-435
29. Diener W, Speiser B, Brand T, Bleese N, Schaper J (1991) Myocyte nuclear hypertrophy and reduced transcriptional activity strongly correlate with human heart failure. *Circulation* 84 (Suppl II), 1752 (abstr)
30. Diener W (1994) Veränderung der Kern-Zytoplasmarelation und andere degenerative Veränderungen bei dilatativer Kardiomyopathie. Gießen
31. Elsässer A (1996) Klinische und morphologische Befunde bei "hibernating myocardium". Gießen

32. Engedal H, Jensen H, Saetersdal TS (1977) Ultrastructure of abnormal membrane inclusions in nuclei of human myocardial cells. *Br Heart J* 39: 145-151
33. Fawcett D, McNutt S (1969) The ultrastructure of the cat myocardium. *J Cell Biol* 41: 1-45
34. Ferrans VJ, Buja LM, Jones M (1973) Ultrastructure and cytochemistry of glycogen in cardiac diseases. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 3: 97-144
35. Ferrans VJ, Massumi RA, Shugoll AN, Ali N, Roberts WC (1974) Ultrastructural studies in myocardial biopsies in 45 patients with obstructive and congestive cardiomyopathy. In: E Bajusz, GE Rona (eds) *Cardiomyopathies*, Urban & Schwarzenberg, Munich, pp 231-272
36. Ferrans VJ, Jones M, Maron BJ, Roberts WC (1975) The nuclear membranes in hypertrophied human cardiac muscle cells. *Am J Pathol* 78: 427-460
37. Ferrans VJ, Maron BJ, Buja LM (1975) Intranuclear glycogen deposits in human cardiac muscle cells: Ultrastructure and cytochemistry. *J Mol Cell Cardiol* 7: 373-386
38. Ferrans VJ, Thiedemann KU (1982) Ultrastructure of the normal heart. In: MD Silver (ed) *Cardiovascular Pathology*, Churchill Livingstone, New York, pp 31-86
39. Figulla HR, Rahlf G, Nieger M, Luig H, Kreuzer H (1985) Spontaneous haemodynamic improvement or stabilization and associated biopsy findings in patients with congestive cardiomyopathy. *Circulation* 71: 1095-1104
40. Frenzel H, Kasper M, Kuhn H, Lösse B, Reifschneider G, Hort W (1985) Licht- und elektronenmikroskopische Befunde in Früh- und Spätstadien der Herzinsuffizienz. Untersuchungen an Endomyokardbiopsien von Patienten mit latenter (LCM) und dilatativer (DCM) Kardiomyopathie. *Z Kardiol* 74: 135-143

41. Gerdes AM, Liu Z, Zimmer HG (1994) Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience* 5: 203-208
42. Ghadially FN (1997) Nucleus. In: *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*, Butterworth-Heinemann Medical, London, pp 1-184
43. Goldberg M, Harel A, Gruenbaum Y (1999) The nuclear lamina. Molecular organization and interaction with chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9: 285-293
44. Gotzman J, Foisner R (1999) Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9: 257-265
45. Görnandt S (1986) Klinik der Kardiomyopathien. In: H Roskamm, H Reindell (eds) *Herzkrankheiten*, Springer, Wien New York, pp 798-858
46. Grove BS, Nair KG, Zak R (1969) Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. III. Changes in DNA content, the relative contributions of polyploidie and mitotic activity. *Circ Res* 25: 463-471
47. Gwathmey JK (1991) Morphological changes associated with furazolidone-induced cardiomyopathy effects of digoxin and propranolol. *J Comp Pathol* 104: 33-46
48. Hammond E, Menlove R, Anderson J (1987) Predictive value of immunofluorescence and electron microscopic evaluation of endomyocardial biopsies in the diagnosis and prognosis of myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 114: 1055-1065
49. Hauptmann S, Poche R (1986) Pathologie der Kardiomyopathie und Myokardiopathien. In: H Roskamm, H Reindell (eds) *Herzkrankheiten*, Springer, Wien New York, pp 771-792

50. Hein S, Brand T, Münkkel B, Zimmermann R, Schaper J (1992) Transcriptional disturbances of contractile and cytoskeletal proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 24 (Suppl V), 192 (abstr)
51. Huhn KM, Palcic B, Wilson JE, McManus BM (1995) Cytometric analysis of ventricular myocyte nuclei in idiopathic dilated cardiomyopathy: A tool for evaluation of disease progression? *Eur Heart J* 16 (Suppl O): 97-99
52. Hutchinson CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA (2001) Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* 114: 9-19
53. Jensen H, Engedal H, Saetersdal TS (1976) Ultrastructure of mitochondria-containing nuclei in human myocardial cells. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 21: 1-12
54. Kajihara H, Tagushi K, Hara H (1973) Electron microscopic observations of human hypertrophied myocardium. *Acta Pathol Jpn* 23: 335-347
55. Katagiri T, Kitsu T, Akiyama K (1987) Alterations in fine structure of myofibrils and structural proteins in patients with dilated cardiomyopathy-studies biopsied heart tissues. *Jpn Circ J* 51: 682-688
56. Kawai C, Matsumori A (1980) Myocardial biopsy. *Ann Rev Med* 31: 139-157
57. Kellerman S, Moore JA, Zierhut W, Zimmer HG, Campbell J, Gerdes AM (1992) Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 24: 497-505
58. Kerr JFR, Bishop CJ, Searle J (1984) Apoptosis. In: PP Anthony (ed) *Recent Advances in Histopathology*, Edinburgh, pp 1-15
59. Kreutzig T (1988) Nucleinsäuren und Molekularbiologie. In: *Biochemie, Kurzlehrbuch und Antwortkatalog*, Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm, pp 77-99

60. Leyton RA, Sonnenblick EH (1969) The ultrastructure of the failing heart. *Am J Med Sci* 258: 304-327
61. Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hirtz TH, Anversa P (1995) Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 73: 771-787
62. Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. *Am J Pathol* 146: 3-15
63. Majno G, Joris I (1996) Symptoms of cellular disease: Pathology of the organelles. In: *Cells, Tissues, and Disease, Principles of General Pathology*, Blackwell Science, Berlin, pp 123-173
64. Mall G, Schwarz F, Derks H (1982) Clinicopathologic correlations in congestive cardiomyopathy study on endomyocardial biopsies. *Virchows Arch* 397: 67-82
65. Maron BJ, Ferrans VJ (1978) Ultrastructural features of hypertrophied human ventricular myocardium. *Progr Cardiovasc Dis* 21: 207-238
66. Meinders-Groeneveld J, James J (1971) Some quantitative data regarding the nucleoli in cell nuclei from rat liver of different ploidy classes. *Z Zellforsch* 114: 165-174
67. Mironescu S, Dragonur C (1967) Number, volume, surface and inner structure of the rat liver cell nucleoli. *Exp Cell Res* 48: 140-145
68. Moir RD, Spann TP, Hermann H, Goldman RD (2000) Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol* 149: 1179-1192
69. Newport JW, Forbes DJ (1987) The nucleus: structure, function and dynamics. *Annu Rev Biochem* 56: 535-565

70. Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick EH, Anversa P (1994) Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodelling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovasc Res* 28: 1199-1208
71. Olsen EGJ (1986) Morphological alterations in the heart muscle of cardiomyopathies. *Cor Vasa* 28: 241-247
72. Oyer CE, Cortez S, O'Shea P, Popovic M (1991) Cardiomyopathy and myocyte intranuclear inclusions in neuronal intranuclear inclusion disease: A case report. *Human Pathol* 22: 722-724
73. Perennec J, Willemin M, Baraer P, Hatt PY (1990) Comparative morphologic and morphometric study of the myocardium in human cardiomyopathy and aortic insufficiency. *J Mol Cell Cardiol* 22 (Suppl IV), S48 (abstr)
74. Perennec J, Willemin M, Pocholle P, Hatt PY, Crozatier B (1992) Cardiac ultrastructural abnormalities in Syrian hamsters with spontaneous cardiomyopathy or subjected to cardiac overloads. *Basic Res Cardiol* 87: 54-64
75. Pyrpasopoulou A, Meier J, Maison C, Simos G, Georgatos SD (1996) The lamin B receptor (LBR) provides essential chromatin docking sites at the nuclear envelope. *EMBO J* 15: 7108-7119
76. Report (1980) The definition and classification of cardiomyopathy - Report of the WHO/ISFC Task Force. *Br Heart J* 44: 672-673
77. Rhodin J (1977) Muscular tissue. In: J Rhodin (ed) *Histology - A Text and Atlas*, Oxford University Press, London Toronto, pp 221-253
78. Rhodin J (1977) Cells and organelles. In: J Rhodin (ed) *Histology - A text and Atlas*, Oxford University Press, London Toronto, pp 7-64

79. Rochael MC, Higuchi MDL, Lopes EA (1990) Bizarre nuclei of myocardial fibers in an infant with dilated cardiomyopathy: Light, electron microscopic, and immunoperoxidase studies of a necropsy case. *Am J Cardiovasc Pathol* 3/4: 321-324
80. Rowan RA, Masek RA, Billingham ME (1988) Ultrastructural morphometric analysis of endomyocardial biopsies. *Am J Pathol* 2: 137-144
81. Rumyantsev PP, Erokhina IL, Antipanova EM, Martynova MG (1990) DNA and sex chromatin content in nuclei of conductive system and working myocytes of normal and hypertrophied human hearts. *Acta Histochem* 39 (Suppl): 225-237
82. Sandritter W (1970) Funktionsstrukturen des Zellkerns. Schattauer, Stuttgart New York
83. Schaper J, Mulch J, Winkler B, Schaper W (1979) Ultrastructural, functional, and biochemical criteria for estimation of reversibility of ischemic injury: A study on the effects of global ischemia on the isolated dog heart. *J Mol Cell Cardiol* 11: 521-541
84. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N (1991) Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 83: 504-514
85. Schaper J, Hein S (1993) The structural correlate of reduced cardiac function in human dilated cardiomyopathy. *Heart Failure* 9: 95-111
86. Schneider R, Pfitzer P (1973) Die Zahl der Kerne an isolierten Zellen des menschlichen Myokards. *Virchow Arch (B)* 12: 238-258
87. Scholz D, Diener W, Schaper J (1994) Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. *Cardioscience* 5: 127-138

88. Schupbach R, Schneider J (1988) Häufigkeit doppelkerniger Herzmuskelfasern in Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie und sekundärer, druck- oder volumenbedingter Hypertrophie. *Z Kardiol* 77: 780-783
89. Schwarz F, Mall G, Zebe H, Blickle J, Derks H, Manthey J, Kübler W (1983) Quantitative morphologic findings of the myocardium in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 51: 501-506
90. Shea JR, Leblond CP (1966) Number of nucleoli in various cell types of the mouse. *J Morphol* 119: 425-434
91. Silbernagl S, Despopoulos A (1988) Die Zelle. Grundlagen der Zellphysiologie. In: Taschenatlas der Physiologie, Thieme, Stuttgart, pp 1-21
92. Simard R, Bernhard W (1966) Le phénomène de la ségrégation nucléolaire: spécificité d'action de certains antimétabolites. *Int J Cancer* 1: 463-479
93. Sobel HJ, Schwarz R, Marquet E (1969) Nonviral nuclear inclusions. I. Cytoplasmatic invaginations. *Arch Pathol* 87: 179-192
94. Soonpa MH, Koh GY, Pajak L, Jing S, Wang H, Franklin MT, Kim KK, Field LJ (1997) Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. *J Clin Invest* 99: 2644-2654
95. Spann TP, Moir RD, Goldman AE, Stick R, Goldman RD (1997) Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol* 136: 1201-1212
96. Stewart A (1990) The functional organization of chromosomes and the nucleus - a special issue. *Trends Genet* 6: 377-379
97. Toussaint M, Pfister A, Da Lage C (1984) Le noyau du myocyte cardiaque dans l'hypertrophie ventriculaire. Etude ultrastructurale. *Bull Assoc Anatom* 68: 59-68

98. Unverferth BJ, Leier CV, Magorien RD, Unverferth DV (1983) Differentiating characteristics of myocardial nuclei in cardiomyopathy. *Hum Pathol* 14: 974-983
99. Unverferth DV, Fетters JK, Unverferth BJ, Leier CV, Magorien RD, Arn AR, Baker PB (1983) Human myocardial histologic characteristics in congestive heart failure. *Circulation* 68: 1194-1200
100. Urie PM, Billingham ME (1988) Ultrastructural features of familial cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 62: 325-327
101. Van der Laarse A, Hollaar L, Vliegen HW, Egas JM, Dijkshoorn NJ (1989) Myocardial (iso)enzyme activities, DNA concentration and nuclear polyploidy in hearts of patients operated upon for congenital heart disease, and in normal and hypertrophic adult human hearts at autopsy. *Eur J Clin Invest* 19: 192-200
102. Vliegen HW, Eulderink F, Bruschke AV, van der Laarse A, Cornelisse CJ (1995) Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 5: 27-31
103. Walker NJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR (1988) Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13: 18-54
104. Warmuth H, Fleischer M, Themann H, Achatzy RS, Dittrich H (1978) Ultrastructural morphometric analysis of hypertrophied human myocardial left ventricle. *Virchows Arch (A)* 380: 135-148
105. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142: 67-77
106. Yonesaka S, Becker AE (1987) Dilated cardiomyopathy: diagnostic accuracy of endomyocardial biopsies. *Br Heart J* 58: 156-161

7. Abkürzungsverzeichnis

DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
NYHA	New York Heart Association
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
rRNA	Ribosomale-Ribonucleinsäure

8. Lebenslauf

Geboren am: 17. November 1964

Geburtsort: Münster in Westfalen

Eltern: Bernhard Heinrichs und Elisabeth Heinrichs, geb. Kleimann

Geschwister: zwei Schwestern und zwei Brüder

Familienstand: verheiratet mit Dr. Ernst H. Barth

Kinder: Theresa Barth, geb. 1996
Julius Barth, geb. 2000

Schulausbildung:

1971-1975	Kath. Grundschule Kinderhaus, Münster
1975-1984	St. Lioba-Gymnasium, Bad Nauheim Abschluß: Allgemeine Hochschulreife (13. Juni 1984)

Studium:

1984-1986	Studium der Germanistik und Rechtswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen und Philipps-Universität Marburg
1986-1991	Studium der Zahnmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen (Zahnärztliche Prüfung am 16. Dezember 1991; Approbation als Zahnärztin am 19. Dezember 1991)

Berufstätigkeit:

12/1991-12/1993	Assistenz Zahnärztin
seit Dez. 1993	Niederlassung als Zahnärztin in Gemeinschaftspraxis mit Dr. Ernst H. Barth in Usingen

9. Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die bei der Erstellung dieser Arbeit durch ihr Wirken und ihre Unterstützung behilflich waren und ohne die die Fertigstellung und das Gelingen nicht möglich gewesen wären.

DANKE...

... Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper danke ich für die Themenstellung, die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik. Durch ihre große Geduld, positive Motivation und liebevolle persönliche Unterstützung und Betreuung auch in schwierigen Phasen ist diese Arbeit erst möglich geworden.

... Herrn Dr. Sawa Kostin gilt mein Dank für die Hilfe bei der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

... Frau Beate Grohmann möchte ich für die ständige freundschaftliche Hilfsbereitschaft und fachliche Hilfe in allen Phasen der Arbeit und für die Ausdauer der Mithilfe danken.

... Frau Brigitte Matzke danke ich für die Notfalleinsätze am Elektronenmikroskop.

... Herrn Dr. Albrecht Elsässer möchte ich für die Diskussionsbereitschaft und die kardiologischen Nachhilfestunden danken.

... Frau Annemarie Möbs gilt mein Dank für die Bewältigung der Fotomengen und die exzellente Ausführung dieser Arbeiten.

... Frau Erika Gassig danke ich für die erfahrene Endbearbeitung meiner Arbeit.

... Herrn Gerd Stämmeler möchte ich für die Hilfe in EDV-Fragen und graphischer Gestaltung danken.

... Allen Mitarbeitern, insbesondere auch Frau Renate Möhren, und Doktoranden der Abteilung Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie danke ich für die Herstellung und zur Verfügungstellung der exzellenten Schnitte und die nette und schöne Atmosphäre, die sehr motivierend für mich war.

... Meiner kleinen und großen Familie danke ich für die Rückenstärkung und den Glauben an dieses Werk, insbesondere meiner Mutter Frau Elisabeth Heinrichs für den tatkräftigen Einsatz beim Babysitten. Dies alles ermöglichte die Freiräume, die für die Vollendung erforderlich waren.

... Meinem Mann Ernst gilt mein Dank für die unendliche Geduld und liebevolle Unterstützung und die computertechnischen Problemlösungen. Meinen Kindern Theresa und Julius möchte ich auch für die tatkräftige Mithilfe bei der Literatursortierung und Markierung wichtiger Textstellen danken.